

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ANÁLISIS DE MUTACIONES GENÉTICAS DE ALCOHOL
DESHIDROGENASA, ACETALDEHÍDO
DESHIDROGENASA Y CITOCROMO P 450 EN PACIENTES
CON HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Antonio Segado Soriano

Bajo la dirección de los doctores

Elpidio Calvo Manuel
Félix Gómez Gallego

Madrid, 2004

ISBN :84-669-2613-5

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Elpidio Calvo Manuel y Félix Gómez Gallego informan que D. Antonio Segado Soriano ha realizado bajo nuestra dirección científica los trabajos conducentes a la elaboración de su tesis doctoral, titulada "análisis de mutaciones genéticas de alcohol deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y citocromo P450 2E1 en pacientes con hepatopatía alcohólica".

Además, informan que por su originalidad y contenido científico, merece ser considerado como satisfactorio para ser defendido por el doctorando.

En Madrid, a dos de junio de dos mil cuatro.

VºBº

EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

DNI

Fdo.: _____
37653677 Fecha y firma)
P. Calvo. DNI

7536805-9
Félix Gómez Gallego

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

DR. JOSE LUIS ÁLVAREZ-SALA WALTHER, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

INFORMO: Que una vez examinado el Trabajo presentado por D. ANTONIO SEGADO SORIANO, titulado: ANALISIS DE MUTACIONES GENETICAS DEL ALCOHOL DESHIDROGENASA, ACETALDEHIDO DESHIDROGENASA Y CITOCROMO P-450 EN PACIENTES CON HEPATOPATIA ALCOHOLICA, dirigido por los Drs. D. Elpidio Calvo Manuel y el Dr. Felix Gomez Gallego, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

03 JUN. 2004

El Director del Departamento

DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Fdo.: _____
Fdo.: Jose L. Álvarez-Sala Walther
(Fecha y firma)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**ANÁLISIS DE MUTACIONES GENÉTICAS
DE ALCOHOL DESHIDROGENASA, ACETALDEHÍDO
DESHIDROGENASA Y CITOCROMO P 450
EN PACIENTES CON HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
ANTONIO SEGADO SORIANO

DIRECTORES
DR. ELPIDIO CALVO MANUEL
DR. FÉLIX GÓMEZ GALLEG0

Madrid 2004

Dedicatoria:

A mi mujer, Fuensanta: con su paciencia me ayudó a superar las dificultades, con sus reflexiones y su alegría, cambió mi vida y me mostró la grandeza del amor.

A mis padres que me enseñaron el valor del sacrificio en el trabajo de cada día y la importancia de la familia.

Agradecimientos:

A mis profesores, en el Colegio e Instituto, en la Facultad, especialmente a aquellos que me mostraron su vocación por la Medicina Interna y por la docencia, como el Dr Jesús Millan. A mis tutores y jefes durante mi residencia en el Hospital Gregorio Marañón, porque siempre confiaron en mí y me enseñaron la verdadera Medicina Interna, la de cada día a la cabecera del enfermo, con especial mención al Dr Jose María Merino y al Dr Luis Pastor.

A todos aquellos que me animaron, que me ayudaron en este trabajo, a veces duro e incierto de la Tesis Doctoral, como mi amigo Javier López, la Dra Lola Vigil y el Dr David Martínez, ambos por su sabiduría estadística, Maria Luisa Herranz y Nora Sánchez de Anatomía Patológica sin cuya colaboración en la recogida de muestras y en las imágenes histológicas hubiese sido difícil este trabajo. Al Dr Emilio Álvarez, jefe del Departamento de Anatomía Patológica que siempre estuvo cuando fue requerido, a pesar de sus múltiples quehaceres. Al Dr Rafael Bañares, especialista en Digestivo, de enorme sabiduría y sin cuyas aportaciones hubiese sido imposible este trabajo, al Dr Luis Alvarez-Sala por su lectura crítica pero certera de las publicaciones generadas. A Ismael López Medel, profesor de humanidades y diseñador informático por su esfuerzo en la presentación, de mayor valor, al ser conocedor de otras ciencias no médicas.

Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento a la Fundación MAPFRE Medicina, la cual posibilitó, gracias a la concesión de una beca de investigación, la realización del presente trabajo.

Por último a mi Director de Tesis Dr Elpidio Calvo por su saber en la dirección de la misma. Mención especial a mi Co-Director de Tesis, Felix Gómez-Gallego, del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la U. Complutense, trabajador infatigable, que nunca reparó en esfuerzos para ver terminada esta Tesis, y a su colaboradora Catalina Santiago, por su buen hacer en las muestras, al Dr Fenando Bandrés jefe de dicho Departamento porque en todo momento consiguieron ilusionarme con el proyecto y alentarme a seguir a pesar de las dificultades, prestándome siempre su ayuda y colaboración. A todos ellos mi gratitud más profunda y sincera .

En la confianza en Dios tenemos la paz (tomado de Luz R.Casanova).

Índice

Capítulo 1: Introducción	13
1.1 Alcohol: problemas derivados de su consumo	13
1.2 Metabolismo del alcohol	24
1.3 El alcohol y su repercusión en la salud	34
1.4 Alcohol: Enfermedad hepática alcohólica y hepatitis alcohólica aguda	40
1.5 Polimorfismos genéticos de las enzimas que intervienen en el metabolismo del etanol y marcadores clásicos de alcoholismo-hepatopatía	51
1.6 Conceptos generales: clasificación de consumo mediante UBES	54
 Capítulo 2: Hipótesis y objetivos	 61
 Capítulo 3: Metodología	 65
3.1 Selección de pacientes. Clasificación	65
3.2 Variables estudiadas	66
3.3 Protocolo	89
3.4 Análisis estadístico	90
3.5 Ética	91
 Capítulo 4: Resultados y discusión	 92
4.1 Variables demográficas, de consumo y víricas	94
4.2 Marcadores biológicos clásicos de etilismo y hepatopatía	94
4.3 Polimorfismos genéticos de las enzimas que intervienen en el metabolismo del etanol	115
4.4 Papel del polimorfismo c2 de Citocromo P4502E1 en la patogénia de la Hepatitis alcohólica aguda	140
 Capítulo 5: Conclusiones	 144
 Capítulo 6: Bibliografía	 148
 Capítulo 7:Anexos	 170

1. Introducción

1.1) ALCOHOL: PROBLEMAS DERIVADOS DE SU CONSUMO

1. 1.1 El alcohol en España

Desde los tiempos bíblicos, el etanol o alcohol vínico ha sido el agente de toxicofilia y de drogadicción más extendido y generalizado, siendo en casi todos los pueblos, a excepción de los musulmanes, la única droga permitida. Su uso ha llegado a estar frecuentemente aconsejado, incluso como alimento y tonificante para niños, merced a unas equívocas creencias populares y encubiertos intereses económicos. En su desarrollo histórico, tanto los patrones de consumo de alcohol, como los de las consecuencias de dicho consumo, han sido considerados de forma diferente según la cultura en que se han producido. Las bebidas alcohólicas han cumplido durante siglos muy diversas funciones simbólicas, tanto de tipo religioso (atribución de poderes superiores a los que la ingerían), como social (ritual de solidaridad o de amistad, este último patrón actual entre los jóvenes). En ciertas culturas el acceso al alcohol ha sido prerrogativa de varones de clase alta, y por esta razón, no se permitía la bebida a mujeres y niños. También la abstención de la bebida posee generalmente un sentido socio-cultural, así para los musulmanes es un deber religioso, en China antigua se esperaba que los gobernantes fuesen abstemios, en el siglo XIX en Inglaterra algunas personas firmaban un juramento de abstinencia. En el siglo XIX el uso de bebidas alcohólicas comienza a plantearse como problema social, colectivo, cuando se dan unas circunstancias socio-culturales que por una parte fomentan y hacen posible su uso generalizado, y por otra, se desarrollan actitudes contrarias, de rechazo, incompatibles con el uso considerado excesivo, e incluso con cualquier consumo de alcohol. En España, a finales del siglo XIX y comienzos del XX, el alcoholismo colectivo se comienza a plantear como una cuestión de

interés sanitario y social, sobre todo por parte de la teoría “higienista”. En el plano social, la lucha contra el alcoholismo, pasó a situarse en íntima relación con cuestiones como la vivienda, las condiciones laborales y la alimentación, cuestiones que afectaban a las clases económicas más débiles. A comienzos del siglo XIX se utilizan diversos términos médicos que hacen referencia a la necesidad imperiosa de consumir alcohol. Es así como el psiquiatra francés Esquirol en 1838 habla de la monomanía del alcoholismo, para definir una enfermedad mental caracterizada por la tendencia irrefrenable de consumir bebidas fermentadas y licores. En 1852 Huns acuña el término alcoholismo para describir no sólo las alteraciones neurológicas derivadas del consumo de alcohol, sino también los cambios conductuales relacionados con dicho abuso. Magnan en 1893 define la dipsomanía como la apetencia patológica e insaciable por las bebidas fermentadas y en 1901 Gaupp señala como signo característico de esta enfermedad la depresión periódica. Bauler en 1924 introduce el concepto de alcoholismo como un trastorno caracterizado por cambios somáticos y del comportamiento (**Herrera A 1999**). La sensibilidad de los medios sanitarios ante los problemas que el alcoholismo planteaba en una sociedad en desarrollo industrial fue alta, en una época en que la higiene y la prevención de las enfermedades eran metas que algunos países europeos empezaban a conseguir. Por esta razón la actitud higienista integró la lucha contra el alcoholismo como uno de sus pilares para el logro de una sociedad más sana. Caracterizaron a esa época la proliferación de estudios, escritos y memorias científicas dedicadas a objetivar y divulgar en los medios científicos las consecuencias sanitarias y sociales del abuso del alcohol, y así mismo la edición de opúsculos y folletos, a veces en forma de cartillas sanitarias con intención de una acción educativa en el nivel individual. Este tipo de actividades se produjo sobre todo

en algunas sociedades científicas, sanitarias y jurídicas, así como en el seno de agregados de población en pleno desarrollo industrial como eran Cataluña, País Vasco y Madrid. En el plano político-asistencial hay que destacar que la primera normativa moderna sobre alcoholismo en España fue el Decreto sobre asistencia psiquiátrica del año 1931. La existencia de Asociaciones y Ligas contra el alcoholismo en España ocurrió relativamente tarde y como movimiento cívico tuvo poco y efímero desarrollo en el devenir de las actividades antialcohólicas. Como más antiguas y de breve existencia se citan la Sociedad Española contra el Alcoholismo, de carácter oficial, y la Liga Antialcohólica Española, de carácter privado (**Santo Domingo J 2000**). Sólo en épocas relativamente recientes se han desarrollado movimientos asociativos para defenderse del alcoholismo, por parte de los propios pacientes y sus familiares. La OMS en 1952 hace referencia al problema de salud mental y físico que supone esta droga. En 1976 es sustituido el término alcoholismo por Síndrome de dependencia al alcohol que queda definido como “un estado psíquico y habitualmente físico, resultante de tomar alcohol, caracterizado por una conducta y otras respuestas que siempre incluyen compulsión por tomar alcohol de manera continua o periódica, con objeto de experimentar efectos psíquicos y, algunas veces, para evitar molestias producidas por su ausencia, pudiendo estar presente o no la tolerancia”.

En el mundo actual, el alcohol es la sustancia psicoactiva más utilizada después de la cafeína. Su uso está muy extendido en la sociedad occidental y su consumo aparece ante nuestros ojos como algo normal. El consumo de bebidas alcohólicas es uno de los principales factores relacionados con el estado de salud de los individuos y las poblaciones en la actualidad. Junto a otros aspectos del estilo de vida, como el consumo de tabaco y de otras

drogas, la actividad física y la nutrición, constituye uno de los principales determinantes de la salud, desde una perspectiva epidemiológica del fenómeno salud-enfermedad. El alcohol es una sustancia cuyo consumo está muy arraigado en la cultura occidental en general, y en la española en particular. Somos uno de los primeros países productores del mundo y el tercer consumidor de Europa. La tolerancia social en el uso y abuso de bebidas alcohólicas es muy grande; sin embargo su capacidad para modificar la conducta, la degradación personal que conlleva su abuso y las consecuencias sobre terceros, sobre todo los accidentes de automóviles, han hecho que exista una mayor conciencia social sobre su peligrosidad (**Sanchez Pardo L 2001**). La importante presencia que tienen las bebidas alcohólicas en la sociedad española queda confirmada por el hecho de que una amplia mayoría (87%) de los ciudadanos de 15-65 años las ha consumido en alguna ocasión o porque el 4.7% las consume con una frecuencia semanal y un 13% diariamente (**Gutierrez JL 1995, Navarro J 1996, Delegación 2002**). Según las encuestas realizadas por el Plan Nacional sobre drogas en los años 1995, 1997 y 1999, 2001 el fenómeno más relevante que se ha producido en las dos últimas décadas ha sido la moderada reducción de los porcentajes de bebedores abusivos, y sobre todo la masiva incorporación de adolescentes y mujeres al consumo de alcohol (**Comunidad de Madrid 2001**).

Según la encuesta domiciliaria de la Agencia antidroga de la CAM del años 2001 la sustancia psicoactiva con mayor prevalencia de consumo es el alcohol (**Comunidad de Madrid 2001**). Un 91% de la población entre 15-65 años lo ha consumido en algún momento de su vida, un 80% en el último año, Además, según diversos estudios los bebedores excesivos o de gran riesgo suponen el 7 % (**Navarro J 1998, Elzo J 2000, Comunidad de Madrid**

2001) En comparación con otras drogas como el cannabis (30% lo ha consumido alguna vez, 1% diariamente) o la cocaína (5% y 0.5% respectivamente). La edad media de inicio de consumo de alcohol en la CAM es entre los hombres a los 15.5 años, entre las mujeres a los 17.5 años, siendo el segmento de población que consume más alcohol el comprendido entre los 25-29 años en ambos sexos (**Tabla 1.1**).

SUSTANCIA	HOMBRES	MUJERES	TOTAL
TABACO	15.6	17.2	16.4
ALCOHOL	15.5	17.5	16.5
CANNABIS	18.2	18.9	18.52
COCAÍNA	19.6	21.8	20.7
EXTASIS	21.3	20.1	20.2
HEROÍNA	24.6	24.6	24.6
SOMNIFEROS	23.6	30.2	26.8
OTROS	23.9	29.7	26.8

Tabla 1.1: Edad Media de inicio al consumo de drogas en la CAM. Se refleja que la droga más pecozmente consumida es el tabaco seguida del alcohol. Tomado de Encuesta Domiciliaria CAM 2001 (**PNSD 2001**).

La evolución de la edad media de inicio de consumo de etanol ha ido disminuyendo progresivamente desde los 17.99 años hasta los 15.50 años en la

actualidad como media entre los varones (**Tabla 1.2**).

GRUPO EDAD	
15-24	15.50
25-34	15.92
15-44	16.90
>45	17.99

Tabla 1.2: Evolución de la edad media de inicio consumo alcohol en varones. Tomado de Encuesta Domiciliaria CAM 2001 (**PNSD 2001**).

Dos son los patrones de consumo en España: el primero está ligado a los hábitos de alimentación, es un consumo diario de alcoholes de baja graduación, generalmente se trata de adultos de predominio en el medio rural o de nivel socioeconómico bajo; el segundo patrón se caracteriza por la ingesta de alcoholes destilados, preferentemente realizado por jóvenes y durante los fines de semana (**Santo-Domingo J 2000**). La encuesta domiciliaria de la CAM 2001 coincide con estos patrones señalando que el bebedor de todos los días es mayoritariamente un hombre con estudios primarios, de entre 40-65 años, casado y que trabaja. El bebedor de fin de semana es hombre pero con casi igualdad con la mujer, de entre 20-30 años, con estudios superiores o en la universidad, que en su mayoría trabaja y es soltero. La bebida más consumida de

		LABORABLES		FIN DE SEMANA	
TIPO BEBIDA	TOTAL	15-19	40-64	15-19	40-64
VINO	0.5	16	2	23.5	
CERVEZA	5	1.6	6	20	20
APERITIVOS	0.6	<0.0	1	0.3	3
COMBINADOS	0.3	<0.0	0.3	29	6
LICORES LIGEROS	<0.0	<0.0	<0.0	<0.0	1
LICORES FUERTES	0.2	<0.0	0.0	3	2

Tabla 1.3: Tipo de bebida según grupo de edad y período de la semana, laborable o fin de semana. Esta tabla señala las diferencias en el tipo de bebida según días de la semana, laborables o fin de semana, demostrando las diferencias entre tipo de modo de beber según grupos de edad. Tomado de Encuesta domiciliaria CAM-2001 (Delegación 2001).

forma diaria sigue siendo el vino, mientras que en el fin de semana es la cerveza, coincidiendo con otros autores (**Elzo J 2000**). El grupo de edad de 15-19 años consume los fines de semana cinco veces más bebidas combinadas (o de alta graduación) que el grupo de 40-64 años (**Tabla 1.3**).

En cinco campos las repercusiones negativas del alcohol son evidentes:

- Medio laboral.
- Accidentes de circulación.
- Medio sociofamiliar: conflictos con amigos, compañeros o vecinos, conflictos con la policía o con la ley, problemas familiares sobre todo repercusiones en la pareja entre los que destacan los malos tratos a la mujer y dificultades económicas.
- Juventud, en relación con consumo los fines de semana y la mezcla con otras drogas.
- Enfermedades relacionadas con el alcohol.

Por último debemos señalar la elevada mortalidad relacionada con el consumo de alcohol. Las estimaciones sobre la mortalidad asociada al consumo de alcohol en España realizadas por la Dirección general de Salud Pública y Consumo (**Mº Sanidad y Consumo**) basadas en la utilización del sistema de cálculo propuesto por el Centre for Disease Control (CDC) de los Estados Unidos, confirman el

importantísimo impacto sanitario que tiene el consumo de bebidas alcohólicas. Sobre la base de la “Estadística de Defunciones según la causa de la Muerte de 1998” se ha estimado que la mortalidad por causa directa del alcohol se sitúa en torno al 3.5% del total (cerca de 12.000 fallecimientos), pudiéndose estimar en torno a un 20% si añadimos causas de muerte relacionadas con el alcohol como los accidentes laborales y de automoción como se ha reflejado en **Tabla 1.4**.

Algunos estudios atribuían en 1990 al consumo de alcohol 194.000 años de vida perdida, destacando el hecho de que los accidentes no intencionales supusieron como media el 49% de los años de vida perdidos por el alcohol entre 1981-1990, de los que casi la mitad corresponderían a accidentes de automoción (**Mondon S 1997, Del Rio C 2000**) La OMS señala que la bebida genera el 9% del gasto Europeo en salud.

1.2 La incidencia del alcohol en el mundo laboral

Las repercusiones negativas del alcohol en el medio laboral revisten gran importancia, y así estudios realizados en numerosos países demuestran que más del 70% de los consumidores de drogas trabajan (**Santo Domingo J 2002**). La población laboral más bebedora es la masculina, de edad

CAUSA MUERTE	Nº MUERTES POR CAUSA	PROPORCIÓN ATRIBUIBLE AL ALCOHOL (%)	Nº MUERTES ATRIBUIBLES AL ALCOHOL
CIRROSIS Y H.CRÓNICA (E-571)	6.624	67	4.348
ACCIDENTES TRÁFICO (E-810-819)	6.154	40	2.462
PANCREATITIS AGUDA (E-577.0)	1.089	42	475
PSICOSIS ALCOHÓLICA (E-291)	54	100	54
ABUSO DE ALCOHOL (E-305.0)	19	100	19
INTOXICACIÓN ALCOHÓLICA ACCIDENTAL (E-860)	9	100	9
SUICIDIO (E-950-959)	3.261	25	815
MIOCARDIOPATÍA ALCOHÓLICA (E-425.5)	33	100	33
GASTRITIS ALCOHÓLICA (E-535.3)	0	0	0
POLINEUROPATÍA ALCOHÓLICA (E-357.5)	4	100	4
PANCREATITIS CRÓNICA (E-577.1)	39	60	23
CÁNCER OROFARÍNGEO (E-140-149)	2.205	50	1.102
CÁNCER DE ESÓFAGO (E-150)	1.797	75	1.348
CÁNCER DE LARINGE (E-161)	1.751	50	875
HOMICIDIO (E-960-969)	355	46	163
TOTAL	22.394		11.730

Tabla 1.4: Mortalidad atribuible al alcohol en España 1998. Ente paréntesis la rúbrica en que se incluye cada causa en la CIE-9. Tomado de INE-2001-Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo.

comprendida entre los 25-44 años. La prevalencia del consumo de alcohol en la población trabajadora supera a la de la población general (**Sanz J 1997, Navarro J 1998, Santo Domingo J 2002**). Un estudio (**Webb GR 1994**) demostró que los trabajadores que presentaban problemas relacionados con el alcohol tenían 2.7 veces más de ausencias en el trabajo por accidentes que los trabajadores que no tomaban alcohol. Hay una serie de circunstancias que favorecen el consumo en el medio laboral, sobre todo en el de la industria y construcción:

- Condiciones materiales y físicas del trabajo (altas temperaturas, horarios prolongados, rotación horaria con alteraciones del ritmo circadiano del sueño).
- Toxicidad ambiental.
- Trabajo a la interperie.
- Esfuerzo físico (construcción, minería, turnos de noche, pesca).
- Carencia de perspectivas de promoción.
- Trabajo monótono o precario.
- Inseguridad laboral.
- Mezcla de idiomas y razas que llevan al aislamiento social (sobre todo afecta a los inmigrantes).
- Movilidad geográfica continua (comerciales, viajeros).

En dos encuestas nacionales a población trabajadora (**UGT-EDIS 1987 y Fundación de Ayuda contra la Drogadicción-FAD 1996, tomado de Navarro J 1998**) se observa un descenso del porcentaje de bebedores excesivos, aunque, siendo importante y sobre todo si a este grupo le unimos el de trabajadores con consumo de riesgo. Según estas encuestas el 60% de los trabajadores tomaron alcohol en la última semana, con una frecuencia de 1-4 veces a la semana en el 35% y diariamente en el 24%. El 13 % de los trabajadores beben de forma excesiva en España (**Navarro J 1998**).

Los problemas de salud relacionados con el alcoholismo en 1998 afectan al 5.6 % de la población laboral de la CAM (**Navarro J 1998**). Los principales resultados en lo referido al consumo de alcohol entre los trabajadores ocupados y parados, en la CAM según este autor son los siguientes:

- El consumo de alcohol está muy extendido entre los trabajadores de nuestra comunidad: el 60% de los ocupados y el 53% de los parados lo tomaron en la última semana.

-En el grupo de bebedores abusivos (en dicho estudio consideran en dicha categoría a los que beben por encima de 75 ml de alcohol puro al día) se encontrarían 108.000 trabajadores (unos 84.000 ocupados y unos 24.000 parados), grupo expuesto a desarrollar hepatopatía alcohólica y otros problemas de salud relacionados con el alcoholismo (**Navarro J 1998**).

-El patrón de consumo varía según la edad: en los jóvenes trabajadores (18-34 años) predomina un patrón semanal (1-4 veces a la semana, sobre todo fines de semana), en edades intermedias (35-44 años) se equilibra el consumo semanal con el de diario y en edades de 45-65 años el mayoritario es el patrón de consumo diario.

-La mayoría de bebedores abusivos son hombres entre 25-34 años (16.5%), frente a un 5.9% de mujeres.

-La tasa de bebedores abusivos en la población ocupada de la CAM es similar a la del resto de España (12.4% vs 14%) (**Navarro J 1998**).

Estimaciones realizadas en la CAM cifran el coste del alcoholismo entre 30.000 y 40.000 millones de pesetas en 2001 (**PNSD 2002**)

Según la Organización Internacional del Trabajo:

-El número de accidentes del trabajo entre las personas con problemas de alcoholismo es 2-3 veces mayor que los que padecen los demás trabajadores, siendo el alcohol y otras drogas responsables del 20-30 % de los accidentes de trabajo.

-Las bajas laborales y el absentismo se llegan a triplicar, siendo la frecuencia de interrupciones en el trabajo 1.4 veces mayor a la del resto de los trabajadores.

-El gasto sanitario y social en concepto de atención médica, bajas e invalideces, así como de jubilación anticipada es el triple en los trabajadores que beben que en los no bebedores.

Por último se ha señalado que el 16% de los trabajadores con consumo de riesgo reconocen que presentan problemas de salud o problemas familiares relacionados con dicho consumo, si bien este porcentaje probablemente esté infraestimado (**Tabla 1.5**).

PROBLEMAS POR ALCOHOL	% SEGUN TRABAJADORES
Accidentes laborales	1.6%
Accidentes tráfico	2.6%
Baja productividad	2.8%
Absentismo	3.1%
Problemas de relación	7.1%
Problemas de salud	8.5%

Tabla 1.5: Consecuencias del consumo de alcohol según los propios trabajadores. Tomado de Navarro J 1998.

Los efectos atribuidos al consumo de alcohol por los servicios de salud laboral quedan reflejados en

Tabla 1.6.

PROBLEMAS LABORALES	% DE SERVICIOS DE SALUD LABORAL
ABSENTISMO	75%
BAJAS LABORALES	58.3%
ACCIDENTES LABORALES	50%
DISMINUCIÓN DEL RENDIMIENTO	50%
INCUMPLIMIENTO DE LA JORNADA	41.7%
COMISIÓN DE MÁS ERRORES	33.3%
AUMENTO DE EXPEDIENTES DISCIPLINARIOS	33.3%
INCREMENTO DEL NUMERO DE DESPIDOS	33.3%

Tabla 1.6: Efectos atribuidos al consumo de alcohol por los servicios de Salud Laboral. Tomado de **Sánchez Pardo 1994**.

1. 1.3 Alcohol y accidentes de tráfico

Las enfermedades mentales y las lesiones por accidente de tráfico constituirán los dos principales problemas de salud de la población mundial en el primer cuarto del siglo XXI, según estimaciones de la OMS. En los últimos dos decenios los accidentes de tráfico han venido siendo uno de los problemas de salud pública de mayor relevancia en países desarrollados, en donde suponen la primera causa de muerte en varones entre los 5 y los 44 años (**González-Luque JC 1988**). En el año 2000 los accidentes de tráfico originaron 45.000 muertes en la Unión Europea, siendo en este ámbito la primera causa de muerte en los jóvenes (**Skog 2001**). En España, los accidentes de circulación siguen suponiendo una de las cinco primeras causas de muerte en la población general (**Mondón S 1997**), además es la primera causa de muerte en los varones.

RANGO EDAD	ACCIDENTES TRAFICO	CARDIOVASCULAR	NEOPLASIAS	HIV
0-14	3.3	3.2	3.1	1.7
15-34	7.3	3.8	7.7	20.6
35-44	5.2	12.7	46.4	10.2
45-54	5.8	34.5	108.7	1.7
55-64	6.7	105.7	227.2	1.1
65-74	9.5	453.3	432.5	1.2
>74	15.2	3.845	980	0.0

Tabla 1.7: Tasa de Mortalidad por 100.000 habitantes en mujeres año 2000.Tomado de OMS 2000

RANGO EDAD	ACCIDENTES TRÁFICO	CARDIOVASCULAR	NEOPLASIAS	HIV
0-14	4.4	5.0	5.4	2.2
15-34	40.2	10.1	9.2	30.2
35-44	22.5	42.6	33.4	53.7
45-54	20.0	117.4	203.1	17.3
55-64	24.8	329.3	534.5	8.9
65-74	26.1	914.7	1095.4	3.5
>74	38.0		3.870	2180

Tabla 1.8: Tasa de Mortalidad por 100.000 habitantes en varones. Tomado de OMS 2000.

nes entre los 15-34 años de edad, lo cual queda reflejado en **Tablas 1.7 y 1.8**.

Durante el año 2000 se produjeron 101.729 accidentes con víctimas, que alcanzaron la cifra de 155.557 (5.776 muertos a 30 días) El impacto sanitario y social de los accidentes de tráfico es mayor aún, ya que más de la mitad de las lesiones cráneo-encefálicas severas y el 60% de las lesiones medulares son consecuencia de un accidente de circulación. Sin duda alguna el alcohol es el factor que, individualmente, contribuye de manera más importante a la producción de los accidentes de tráfico (**González JC 1988**). La presencia de alcohol como principal factor de riesgo se observa especialmente en los accidentes más graves. En un reciente estudio español (**Instituto de Toxicología 2001**) sobre muestras obtenidas en conductores fallecidos en accidentes de tráfico, se observó que el 43% de los varones y el 23% de las muje-

res presentaban tasas de alcoholemia por encima de 0.1 gr/l. De un total de 1.191 cadáveres analizados de conductores fallecidos en accidentes de tráfico en 1999, en el 37.4% se detectó la presencia de alcohol, bien sólo o junto con otros psicofármacos o drogas de abuso.Además en el 35% de cadáveres de peatones atropellados durante el año 1999 se identificó la presencia de alcohol, debiéndose destacar que uno de cada cuatro peatones atropellados, presentaba tasas de alcoholemia superiores a 0.5 gr/litro (**PNSD 2001**). El alcohol modifica las capacidades del conductor afectando a dicha conducción lo cual ha quedado reflejado en la **Tabla 1.9** de este estudio.

De una manera general se estima que el conducir bajo los efectos del alcohol es el responsable del 40% de los accidentes con víctimas mortales, del 15-35% de los que causan lesiones graves y del 10% de los que no causan lesiones (**Prada C 1996**,

ALCOHOLEMIA= GRAMOS/ L	ESTADO	SÍNTOMAS
< 0.3	SOBRIO	NORMAL
0.3 – 0.5	INTOXICACIÓN LEVE	LIGERA INCOORDINACIÓN
>0.5 – 0.9	EUFORIA	SOCIABILIDAD, AUTOCONFIANZA, ENLENTECIMIENTO, ATAXIA
1 – 1.5	EMBRIAGUEZ-EXCITACIÓN	ATAXIA SEVERA, INESTABILIDAD EMOCIONAL, ALTERACIÓN JUICIO Y PERCEPCIÓN
>1.5 – 2	CONFUSIÓN-BORRACHERA	TRASTORNO MEMORIA, DESORIENTACIÓN, SOMNOLENCIA
>2 - 3	ESTUPOR	DÉFICIT MOTORES, DISMINUCIÓN DE CONCIENCIA, TRASTORNO DEL HABLA
>3 – 4	COMA SUPERFICIAL	DISMINUCIÓN DE REFLEJOS, INSUFICIENCIA RESPIRATORIA
>4 – 5	COMA PROFUNDO	HIPOTERMIA, HIPOGLUCEMIA, CONVULSIONES, DISMINUCIÓN SEVERA NIVEL DE CONCIENCIA
> 5	MUERTE SEGURA	ALGUNOS CASOS DE SUPERVIVENCIA

Tabla 1.9: Correlación entre alcoholemia y síntomas.

González-Luque JC 1988). Los datos de nuestro país indican que el 62% de los conductores han bebido alcohol en la última semana, siendo el 16%, similar a la población general, los bebedores excesivos (más de 9 UBES/día en varones y 8 UBES/día en mujeres) (**Alvarez FJ 2001**)

1. 1.4 El alcohol y el medio socio-familiar

Es un problema no excesivamente cuantificado, pero de gran repercusión en nuestro medio. El alcohol origina diversos problemas en el campo socio-familiar, entre ellos:

1º Problemas de relación con los demás (amigos, compañeros o vecinos), en diversos estudios se estima entre un 3-13 % (**Brismar 1998, Martín AP 2000**)

2º Conflictos familiares, entre ellos la violencia doméstica, malos tratos a los hijos y fracaso escolar (**Alarcón C 1989**). La violencia doméstica se constata entre un 3-5% entre los bebedores mode-

rados y excesivos. Sin embargo esta cifra que podría considerarse irrelevante tiene una repercusión importante cuando hablamos de la violencia hacia la pareja o hacia los hijos, siendo el consumo de alcohol el principal factor (50-70%) de los casos de violencia doméstica y se relaciona con el 80% de los casos de muerte de mujeres a manos de su pareja en España (**Seminario: Violencia, mente y cerebro, Centro Reina Sofía para el estudio de la Violencia, Valencia 5-6 Noviembre 2002, tomado de Santo Domingo J 2002**). Algunos autores (**Ortiz AL 1997**) en un estudio para la Oficina del Defensor del Pueblo, ponían de manifiesto que la mitad de las víctimas de malos tratos, atribuyen al alcohol la causa principal de la violencia sufrida, seguida por las otras drogas o la combinación de ambas. La gravedad de los problemas familiares se intensifica cuando se da en el hogar una dependencia a las bebidas alcohólicas por parte de ambos cónyuges. La mayoría de estos datos proceden de las mujeres entrevistadas en las asociaciones de ex-alcohólicos rehabilitados, quienes

apuntan como uno de los motivos más señalados por el que sus cónyuges o parejas iniciaron las conductas violentas, su propio consumo con valores cuantitativos similares a los de sus parejas **(Díaz RM 2001)**. En este sentido se ha podido apreciar la relevancia otorgado al consumo de alcohol por parte de uno o ambos cónyuges como factor de vulnerabilidad relacionado con la violencia doméstica **(Wetzel JW 1991)**. Estudios españoles **(Avila J 1986)** ponen de manifiesto que las mujeres cuyo padre era bebedor excesivo crónico, iniciaron muy joven el consumo de alcohol, y que los conflictos en el matrimonio representaban uno de los principales problemas que causa el inicio en la bebida. En el 90% de los pacientes consumidores excesivos y crónicos existen conductas violentas centradas en el ámbito familiar y en un 30% de casos estas llegan a ser extremadamente agresivas **(Martín AP 2000)**. La influencia de uno de los progenitores bebedor excesivo en los hijos se pone de manifiesto en estudios que señalan que el 25% de los adolescentes con consumo abusivo de fin de semana son hijos de bebedores excesivos **(Wilson C 1978)**. El porcentaje de niños maltratados con padres alcohólicos asciende al 30% en Holanda y al 50% en Italia. En España algunos autores **(Alarcón C 1989)** vienen a confirmar la presencia en los hijos de alcohólicos de problemas de aprendizaje, falta de sueño, bajo rendimiento escolar, ansiedad y conductas depresivas.

3º Conflictos económicos, gravísimos en el caso de los bebedores excesivos, siendo responsable el alcoholismo del 80% de los casos de mendicidad en nuestro medio.

4º Conflictos con la policía y la ley, si excluimos los accidentes de tráfico aparecen en el 4% de los bebedores moderados y excesivos. La OMS calcula que el 50% de las muertes por heridas exclu-

yendo a los accidentes de tráfico, están relacionadas con el alcohol, en edades comprendidas entre 15-30 años.

1.1.5. Alcohol y Juventud:

un problema creciente

Otro problema especialmente serio en nuestra Comunidad Autónoma es el inicio del consumo en edades cada vez más tempranas observándose las mayores prevalencias del mismo entre los 16-24 años (4% de bebedores abusivos y 4% de bebedores de riesgo en este grupo de edad) **(PNSD 2001)**. Según un estudio de pacientes ambulatorios con enfermedad hepática por alcohol **(Ledro D 2001)** la edad de inicio fue de 17.6 años en los varones y más tardía (31.2 años) en las mujeres. Según otros autores la edad de inicio es más precoz, como señala el estudio realizado en la Universidad Complutense de Madrid, que señala como edad de inicio los 14-15 años **(Gómez-Rabago ML 2001)**. El 87% de españoles de 15-16 años aseguran que lo ha probado alguna vez y el 60% lo ha bebido en el último mes **(Elzo J 2000)**.

Si relacionamos alcohol-accidentes de tráfico-juventud, sabemos que su ingesta es el principal factor relacionado con los accidentes de tráfico en los jóvenes de la Unión Europea, originando cerca de 20.000 fallecimientos anuales en la U.Europea. La OMS considera que el 25% de las muertes en los jóvenes (15-29 años) se relaciona con el alcohol: accidentes de tráfico, suicidios, reyertas **(Smith G 1999)** con resultado de muerte **(Cherpitel C 1993, Brismar B 1998, Skog AJ 2001)**.

1.1.6 Los costes económicos del alcoholismo. Limitaciones y resultados en España.

1.1.6.1 Los Estudios de costes económicos: fundamentos

El estudio de los costes económicos del consumo de alcohol se aborda usualmente mediante una metodología específica denominada “estudios del coste de la enfermedad (**CdE, cost of illness studies**)” (**Maynard A 1987, Collins DJ 1991, Harwood H 1998**), donde el impacto de un determinado problema de salud sobre el bienestar de la sociedad es valorado mediante la valoración de los siguientes parámetros:

- Cuantificación de los costes de los recursos empleados para su prevención y tratamiento.
 - Costes legales atribuibles.
 - Pérdidas de productividad derivadas de su morbilidad y mortalidad específicas.
 - Pérdida de años de vida ajustados por calidad.
- Todo ello respecto a un escenario utópico de inexistencia del problema.
- Más allá de E.Unidos y Canadá, muy pocos países disponen de estudios CdE de alcoholismo rigurosos (**Robson L 1995**).

En su expresión más simple, los estudios CdE combinan datos epidemiológicos con datos económicos para obtener una cifra, en unidades monetarias, que informa de los costes que un determinado problema de salud impone a la sociedad (**Heien DM 1993**). Los primeros sobre costes de alcoholismo se realizaron en Australia, Canadá y Estados Unidos en la década de los 60 (**Pritchard HM 1971, Berry R 1973**). Los estudios de coste de la enfermedad estiman el impacto de la enfermedad como una medida de bienestar social, estrechamente vinculada al Producto Interior Bruto (PIB). El consumo de alcohol produce costes externos que en el contexto de los estudios CdE suelen llamarse costes sociales, por hacer referencia a los costes soportados por el resto de la sociedad (**Wagstaff A 1987, Heien DM 1993**).

En los estudios CdE sólo los costes sociales deben ser considerados, ya que son los únicos relevantes desde un punto de vista de las políticas públicas.

La operativa de los estudios CdE en el abuso de alcohol incluye tres elementos:

- Identificar las consecuencias del abuso de alcohol.
- Documentar la causalidad entre el abuso de alcohol y tales consecuencias, y en su caso, la fracción atribuible al mismo.
- Asignar valores monetarios.

1º Consecuencias del consumo de alcohol:

Estas consecuencias deben ser tangibles y susceptibles de medición, tanto en su incidencia como en el nivel de recursos que implica su existencia. En general se admiten las siguientes:

- Tratamientos por abuso de alcohol: Se refiere a los servicios prestados a causa del abuso de alcohol y suele ser la que dispone de información más fiable. La atención sanitaria suele ser codificada mediante la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE), que incluye diversos códigos diagnósticos relacionados directamente con el alcohol. Suele ser bien recogido en el medio hospitalario, extrapolando los datos a otros ámbitos como la Atención Primaria.
- Tratamientos por enfermedades asociadas y traumatismos: la fracción atribuible al alcohol se lleva a cabo a partir de estimaciones realizadas por estudios epidemiológicos.
- Prevención.
- Mortalidad prematura.
- Pérdidas de productividad laboral.
- Destrucción de la propiedad por crímenes o accidentes.
- Gastos de justicia penal.

-Encarcelamiento y costes de la carrera criminal.

2º Causalidad y fracciones atribuibles

Se basan en establecer las fracciones atribuibles de morbilidad y mortalidad relacionadas con el alcohol con un alto grado de fiabilidad. No obstante, muchos de estos estudios se basan en población hospitalaria, y es dudoso que los riesgos de mortalidad y morbilidad en la población general sean los mismos.

3º Modelos de estimación de costes

1.1.6.2 Estudios del coste del alcoholismo en España.

No ha habido una gran proliferación de estudios sobre el coste del alcoholismo en España. Algunos autores sólo lo han estudiado en Cataluña (**Rovira J 1982**) Uno de los más actuales y de mayor verosimilitud es el de Portella (**Portella E 1998**). Los resultados del estudio cifran en 637.718 millones de pesetas los costes sociales anuales ocasionados por el consumo excesivo de alcohol en España. En términos comparativos esta cifra representó el 16% del presupuesto sanitario de las administraciones públicas para el año 1997. El estudio no consideró el coste de las consultas externas en centros hospitalarios, las indemnizaciones por muerte o invalidez de accidentes, los costes del síndrome alcohólico fetal, el coste de los años potenciales de vida productiva perdidos y el coste monetario de los años potenciales de vida perdidos. Por tanto serían los gastos mínimos producidos por el abuso de alcohol en España.

1.2) METABOLISMO DEL ALCOHOL

1.2.1 Toxicología del alcohol etílico

Con el término alcohol se designa vulgarmente al etanol o alcohol etílico, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, segundo de los alcoholes de la serie alifática o de cadena lineal. Se trata de un hidrocarburo alifático, cuyo peso mo-

lecular es de 46 y ligeramente polar, lo que le permite atravesar las membranas celulares. El término alcohol, sin embargo, procede del árabe, formada por el artículo al y gochl o kohl (lo sutil, lo suave) con que se designaba un polvo cosmético de antimonio y galena o negro de humo, usado por las mujeres para pintarse los párpados. El alcohol etílico o etanol es el nombre químico que recibe el alcohol derivado de la fermentación de la glucosa, otros azúcares y el almidón por la acción de las levaduras.

Debido a los fuertes impuestos con que se grava el alcohol vínico en todos los países, el alcohol destinado a usos industriales se impurifica o marca con sustancias de señalado olor o sabor que impidan su empleo para bebidas; estas sustancias son metanol, piridina, brucina etc..El "reglamento nº 3.199 de la Comisión de la Comunidad Económica Europea "(C.E.E), relaciona los desnaturalizantes empleados en cada país, y que en España, por cada hectólitro de alcohol puro consisten en 1 gr de benzoato de denatonio, 2 litros de metiletilcetona (butanona) y 0,2 gr de azul de metileno. El etanol así impurificado no está sometido a tales impuestos. Industrialmente se puede obtener por destilación de la madera, junto con alcohol metílico o acetona, formando el llamado "alcohol de quemar", pero el proceso más común se basa en la fermentación de los azúcares. Este es el sistema seguido por los pueblos desde la antigüedad para fabricar bebidas alcohólicas a partir de zumos de frutas, miel, leche, macerados de granos etc...Se acepta que la fermentación alcohólica fue una de las primeras reacciones químicas estudiadas por el hombre (**Lavoisier, 1743, tomado de Santo Domingo J 2002**). Cuando estos líquidos, ricos en hidratos de carbono, se dejan fermentar originan los vinos y cervezas; de los jugos fermentados puede separarse el etanol por destilación. Este alcohol puede dejarse envejecer en barricas o toneles de madera,

normalmente de roble y que generalmente han contenido vino con anterioridad para producir el whisky y el brandy o coñac. La destilación puede realizarse en presencia de plantas o se le adicionan extractos vegetales aromáticos y azúcar para elaborar los licores y anises. La riqueza o graduación alcohólica suele expresarse en mililitros de alcohol por 100 mililitros de líquido (%) o grados centesimales. Las bebidas pueden en general clasificarse en dos grandes grupos: 1º Fermentadas, que proceden de un fruto o grano, como la cerveza, vino o sidra, también llamadas de baja graduación. 2º Destiladas, que se obtienen destilando una bebida fermentada, o sea, eliminando a través del calor parte del agua que contiene, lo que provocará que sean más ricas en alcohol, por lo que se llaman de alta graduación, entre las que encontramos el whisky, vodka, ron, aguardiente. La Unión Vitivinícola Internacional define las siguientes clases de bebidas alcohólicas:

-Mosto: Es el líquido resultante del prensado de uvas frescas, antes de comenzar la fermentación, Si se inhibe esta mediante técnicas físicas o químicas, se obtiene el mosto apagado o sin alcohol.

-Vinos: Se forman por fermentación natural del mosto, gracias a las levaduras presentes en la piel de la uva. A su vez se distinguen:

+Vinos generosos: fabricados por añejamiento de vinos en condiciones que le confieran aroma y paladar característicos, y la adición de alcohol etílico para alcanzar una graduación del 15-23%. Son los tipos jerez, oporto etc.

+Vinos espumosos: al descorchar la botella desprenden burbujas de anhídrido carbónico, en el llamado vino con aguja el carbónico, en escasa cantidad, se forma al terminar la fermentación después del embotellado. El vino espumoso de crianza en cava (champan) experimenta en la botella una segunda fermentación de azúcares naturales o

añadidos, originando gas a una presión de más de 4 atmosferas, a 20°C.

Cerveza: Era ya preparada por los sumerios y antiguos egipcios, su nombre procede de la diosa Ceres, para aludir a los cereales. Es una bebida fabricada por fermentación de un macerado de granos, generalmente malta y añadido de lúpulo para darle sabor amargo.

Aguardientes: Este término engloba a una gran familia de bebidas (de graduación inferior al 80%) obtenidas por envejecimiento de las fracciones alcohólicas del destilado de líquidos fermentados.

Brandy: Palabra procedente de la holandesa "brandewijn" (destilado de vino), utilizada después de que se prohibiera el uso general del nombre de coñac, reservado, por denominación geográfica de origen, a la bebida producida en la ciudad francesa de Cognac, en la región de Burdeos. En España la mayor producción procede del destilado de vinos de jerez. El destilado se envejece en barriles de roble.

Ron: Procede del destilado del zumo de la caña de azúcar o de los jarabes o melazas, fermentados.

Whisky: Es un destilado de los macerados fermentados de trigo, cebada y centeno, arroz y maíz. La cebada es malteada y los restantes cereales se someten a sacarificación del almidón mediante calentamiento en agua acidulada.

Vodka: El destilado alcohólico se rectifica con carbón de leña para lograr aroma y sabor característicos.

Licores: Son aguardientes compuestos, contienen además de alcohol, extractos de plantas aromáticas y azúcares, entre ellos se encuentran el anís, ginebra, cointreau etc..

De conformidad con el Código Alimentario Español, la presencia de alcohol metílico o metanol, que se forma también en las fermentaciones, aunque en pequeña proporción, está limitada a 0.5 gr/l en los vinos y licores.

Las bebidas que contienen etanol son marcadas

con una etiqueta, donde figura el porcentaje de etanol por volumen (% v/v) o grado alcohólico, que corresponde a volúmenes de etanol por 100 volúmenes de solución, esto es equivalente al número de mililitros de etanol puro por 100 ml de bebida. El peso de etanol contenido en un volumen de bebida depende tanto del porcentaje de etanol por volumen como de la densidad absoluta del etanol, esta varía con la temperatura ambiente, siendo de 0.79 g/ml a 20° C, por lo tanto una solución con 10 % v/v a 20°C contiene 7.91 gr de etanol en cada 100 ml. La equivalencia de capacidades queda reflejada en **Tabla 1.10**.

TIPO BEBIDA	GRADOS	C.C ALCOHOL POR LITRO
CERVEZA-SIDRA (BAJA GRADUACIÓN)	4°	40
VINO-CHAMPÁN (GRADUACIÓN MEDIA)	12°-18°	120-180
VERMOUTH (GRADUACIÓN MEDIA)	18°	180
ANÍS, RON, WHISKY, COÑAC	45°	450
VODKA, GINEBRA, AGUA DEL CARMEN (ALTA GRADUACIÓN)	50°	500

Tabla 1.10: Equivalencia grados de alcohol con c.c de alcohol por litro.

El cálculo de los gramos de alcohol ingeridos según el tipo de bebida queda reflejado en **Tabla 1.11**.

TIPO DE BEBIDA	CERVEZA	SIDRA	CAVA	VINO DE MESA	JEREZ-O PORTO	VERMUT	LICORES (GINEBRA, VODKA, RON, ANÍS)
GRADOS	3-6	3-8	10-12	10-16	18-20	18-22	45-60
GRAMOS DE ALCOHOL= ML INGERIDOS X GRADOS X 0.8 / 100							

Tabla 1.11: Fórmula para el cálculo de los gramos de alcohol ingeridos

1.2.2 Toxicocinética del etanol

El paso del etanol a través del cuerpo humano puede ser descrito por diversas fases que incluyen absorción, distribución a nivel de los tejidos, metabolismo y excreción en forma inalterada o de sus metabolitos. Por su estructura química, el alcohol etílico es más hidrófilo que liposoluble (**Aragón C 2002**), de ahí que su absorción a través de las membranas biológicas y difusión por la sangre se realice rápidamente, con tropismo hacia el sistema nervioso. Se absorbe fácilmente por vía intestinal e inhalatoria. Se admite que la absorción por la mucosa bucal es pequeña, que del estómago puede pasar directamente a la sangre (20%) y que la mayor absorción (80%) se produce en el intestino delgado debido al elevado flujo sanguíneo y la amplia superficie de contacto (**Aragón C 2002**). Más de la mitad del alcohol ingerido se absorbe en la primera media hora y el resto en las tres horas siguientes. Estimar el porcentaje de dosis de alcohol que es absorbido por cada región es muy difícil de realizar debido a la variabilidad de la motilidad gástrica e intestinal, el tiempo de vaciamiento gástrico y el flujo regional sanguíneo. Se ha demostrado que aproximadamente 1-2 gr de alcohol son formados endógenamente por fermentación microbiana, considerando como concentración normal de alcohol en sangre aproximadamente 0.002 gr/dl. Una vez el alcohol llega a la sangre se difunde rápidamente por todos los tejidos del organismo, a los que impregna en proporción a

su contenido en agua; las menores concentraciones se encuentran en el esqueleto, por su menor proporción en sangre, y el tejido adiposo, porque el coeficiente de reparto del alcohol entre agua/lípido (suero/grasa) favorece su retención por la sangre. Según las determinaciones efectuadas en cadáveres (**Lands W 1998**) las concentraciones de alcohol crecen en el orden cerebro<sangre<humor vítreo<LCR<fluido pericárdico, excluyéndose el contenido estomacal, que no tiene ninguna significación. La cantidad total de agua en el cuerpo influye en la concentración de alcohol en la sangre, lo que explica las diferencias que aparecen con la edad, y entre el hombre y la mujer, ya que ésta posee mayor proporción de grasa. Durante el período de distribución, hasta alcanzar el equilibrio, la concentración de alcohol es más alta en la sangre arterial que en la venosa, lo que favorece la difusión pasiva y la rápida llegada al cerebro, a causa de la gran irrigación de éste, lo que puede dar una sensación de afectación o mareo precoz. Sigue un período de redistribución con paso del alcohol desde los compartimentos periféricos al central; entonces la concentración en sangre venosa puede ser mayor que en la arterial. Posteriormente se establece un equilibrio dinámico de concentraciones; todas estas fases se aceleran con el ejercicio muscular y se enlentecen con bajas temperaturas ambientales. Lógicamente, el efecto fisiopatológico agudo del etanol será función directa del grado de impregnación del sistema nervioso central, y éste de la concentración en la sangre. Desde el mismo momento de la llegada del alcohol a la sangre se inicia su eliminación, lo que se efectúa a través de su metabolismo hepático, y en menor proporción en otros lugares, como la mucosa intestinal (**Lands W 1998**). Por ello, su cinética es muy diferente de los compuestos que se excretan por la orina. En forma intercambiada se excreta tan sólo aproximadamente un 10% del etanol absorbido, a través del aliento, saliva, heces,

orina, sudor y la leche. La eliminación por el aliento supone casi la mitad de ese 10%. La alcoholemia es una función de la cantidad de alcohol absorbido por unidad de tiempo y su eliminación. Por ello, es afectada por numerosos factores:

-Contenido estomacal previo: si el estómago está vacío se produce un rápido paso al duodeno y a la sangre, si hay ingestión simultánea de alimentos sólidos se retrasará el vaciamiento gástrico, limitando la absorción, e incluso alimentos como las grasas incrementan la retención.

-Bebida ingerida: A su vez depende de dos factores:

1º Clase de bebida: una bebida gaseosa producirá la replección gástrica, acelerando el vaciamiento.

2º Graduación alcohólica: las bebidas de fuerte graduación proporcionan a la sangre la mayor cantidad de alcohol en menor tiempo, sin embargo, una gran cantidad de bebida suave puede dar lugar a replección gástrica y rápida absorción. Está demostrado que el paso de etanol a la sangre, desde el tracto gastrointestinal, es más rápido cuando la bebida tiene concentraciones comprendidas entre el 20-30% de alcohol. La relación entre graduación y c.c de alcohol por litro se ha reflejado en el presente estudio en **Tabla 1.10**.

Bebidas más diluidas presentan bajo gradiente de concentraciones, y se absorben más lentamente. Por su parte, soluciones más concentradas enlentecen el vaciado gástrico, paralizan la musculatura lisa y producen deshidratación y erosión de la mucosa, todo lo cual se traduce en menor velocidad de absorción. Además, las proporciones de carbohidratos, proteínas, ácidos y sales orgánicas, alcaloides y la capacidad tampón de cada tipo de bebida influyen en la rapidez de asimilación (**Guerri C 2000**).

3º Estados fisiopatológicos: Cualquier modificación en la motilidad gastrointestinal o en su morfología, bien inducidos por factores externos o internos, puede producir importantes modificaciones en el ritmo de absorción. Así se puede: 1º Incrementar la absorción: Cuando aumenta la motilidad intestinal (gastritis o úlcera gástrica), cuando aumenta la capacidad de absorción gástrica (estados febriles), cuando se acelera el vaciado gástrico (gastrectomías). 2º Reducción de la absorción: Cuando disminuye la motilidad gástrica (nauseas, shock), cuando disminuye la capacidad de absorción gástrica (ejercicio físico mantenido, dolor), cuando se retrasa el vaciamiento gástrico (ansiedad, cancer gástrico).

4º Fármacos: Diversos fármacos pueden afectar al ratio de vaciamiento gástrico y por tanto alterar la absorción del etanol. De esta manera nos encontramos: 1º Fármacos que disminuyen el vaciamiento gástrico como los de acción anticolinérgica (atropina, antidepresivos tricíclicos), opiáceos, fármacos adrenérgicos como anfetaminas, antidiarreicos. 2º Fármacos que aceleran el vaciamiento gástrico: antieméticos como metoclopramida, antibióticos como eritromicina.

Aparte del ya señalado efecto del alcohol sobre la mucosa gástrica y la acción enlentecedora de esta sustancia sobre el vaciado gástrico, se admite un primer paso metabólico del etanol en la mucosa gástrica merced a una isoenzima de la alcohol deshidrogenasa (ADH), muy activa, que mientras el alcohol se retiene en el estómago, ve reducida su biodisponibilidad (fracción de la dosis que logra pasar a la sangre).

En conjunto, lo que cuenta para la acción fisiopatológica es la cantidad total de alcohol ingerido, sin importar, ni el número de libaciones ni la mezcla de bebidas diferentes.

1.2.3 Vías metabólicas que intervienen en el metabolismo del etanol

Como hemos mencionado, la mayoría del alcohol se absorbe en el duodeno, siendo metabolizado alrededor del 90% en el hígado, y el resto eliminado por el riñón o a través de los pulmones.

En el interior de la célula hepática el alcohol sufre dos procesos oxidativos o dos vías metabólicas, (FIGURAS 1.1 y 1.2) ambas conducen a la forma-

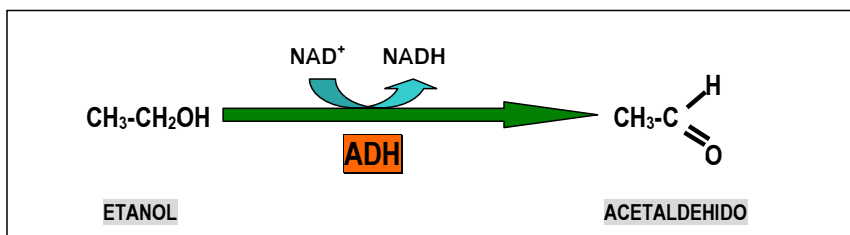


FIGURA 1.1 Metabolismo del alcohol

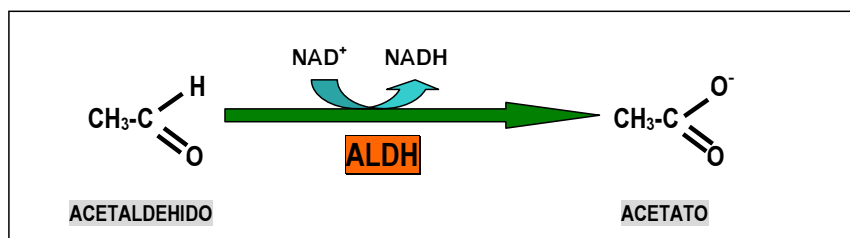


FIGURA 1.2 Metabolismo del alcohol

ción de acetato con la síntesis intermedia del acetaldehído:

+ La más importante desde el punto de vista cuantitativo tiene lugar en el citosol de los hepatocitos, por medio de la enzima **Alcohol deshidrogenasa (ADH)**. Esta enzima no es específica para el etanol, pues en procesos fisiológicos interviene en la oxidación de diferentes grupos alcohólicos. La ADH convierte el etanol en acetaldehído, con la concomitante producción de NADH, actuando como coenzima el nicotín adenín dinucleótido (NAD). Los equivalentes reductores liberados NADH y H⁺ son unos de los motivos del daño que aparece en el hígado del alcohólico, forzado en su neutralización. Los requerimientos de oxígeno y los cambios en el potencial redox se traducen en una hipoxia local relativa (zona perivenular) que contribuyen al daño localizado. La acción oxidativa del alcohol tiene lugar en el citosol del hepatocito, con una distribución segmentaria (la actividad enzimática se incrementa desde la región periportal hacia la zona perivenosa). Otros tejidos además del hígado, como mucosa gastrointestinal, riñón, músculo, participan minoritariamente en el metabolismo del etanol, por bajo del 20% de la dosis (**Aragón C 2002**). La actividad de la ADH en los testículos aumenta tras ingestión de alcohol, lo que podría alterar los niveles de testosterona.

El segundo paso oxidativo es la formación de acetato a partir del acetaldehído, acción catalizada por la enzima **Acetaldehído deshidrogenasa (ALDH)**, que también transfiere hidrogeniones al NAD, contribuyendo a aumentar el desequilibrio redox. El acetato se incorpora al ciclo de Krebs en forma de acetil coenzima A, conduciendo a CO₂ o bien participan en la síntesis de ácidos grasos, esteroides o cuerpos cetónicos. Aunque existen múltiples formas de ALDH en hígado, la enzima

mitocondrial, codificada por el gen ALDH2 situado en el cromosoma 12 parece ser la principal responsable de la oxidación de la mayor parte del acetaldehído generado durante el metabolismo del etanol, habida cuenta de la gran afinidad que muestra por este sustrato. La vía de la ADH es saturable en situaciones de ingesta crónica.

Tradicionalmente, el acetaldehído acumulado en el organismo ha sido implicado en los efectos aversivos que produce el etanol (**Chao HM 1995**). De este postulado se derivan la mayoría de las terapias farmacológicas utilizadas para combatir el alcoholismo, que tratarían de impedir el metabolismo hepático del acetaldehído administrando inhibidores de la ALDH como el disulfirán y la cianamida. En humanos el acetaldehído se encuentra en niveles elevados durante la intoxicación por etanol. Este fenómeno causa diferentes efectos que en general son conocidos como “sensibilidad al alcohol” e incluyen: vasodilatación asociada a incrementos en temperatura cutánea, efectos subjetivos de calor y “flushing” facial, incrementa la tasa cardíaca y respiratoria, disminuye la presión sanguínea, sequedad de mucosa bucal y de garganta hecho que va asociado con broncoconstricción, náuseas y dolores de cabeza. La mayoría de esta sensibilidad al alcohol esta claro que es mediada por el acetaldehído porque es bloqueada cuando se administran inhibidores de la ALDH como el disulfiram o la cianamida (**Kupari M 1983**). Las náuseas y los dolores de cabeza son síntomas típicos de la sensibilidad al alcohol producidos en tratamientos con inhibidores de la ALDH, lo que vincula al acetaldehído con los efectos de la resaca. Junto a esto el acetaldehído parece que juega un papel en el desarrollo de otros efectos del alcohol a nivel del daño cerebral, cardiopatía, pancreatitis y síndrome alcohólico fetal (**Eriksson CJP 2000**). Junto a los efectos tóxicos del acetaldehído cada vez más

autores lo relacionan con los efectos psicofarmacológicos que se le atribuyen al propio etanol (**Chao HM 1995, Smith BR 1997, Zimatkin SM 1997**). En los últimos años se han descrito algunos efectos derivados de la exposición del tejido cerebral al acetaldehído, in vitro e in vivo (**Kuriyama S 1987, Reddy BV 1995**). Se ha demostrado la capacidad del mismo para promover diferentes efectos en los sistemas clásicos de neurotransmisión, así como, en los mediados por neuropéptidos. Así, en estudios de cultivos de neuronas se han constatado cambios en las tasas de ligamientos de diferentes tipos de receptores GABAérgicos, NMDA y acetil colina (**Kuriyama S 1987**). Hace más de dos décadas que se demostró la capacidad del acetaldehído para promover la liberación de noradrenalina en terminales del S. Nervioso periférico y central, posteriormente se han constatado para dopamina y serotonina (**Ortiz A 1974**). También hay datos que indican que la actividad de la enzima ALDH se correlaciona positivamente con la actividad de la MAO y con otras medidas de actividad dopaminérgica (**Zimatkin SM 1991**). En humanos se ha demostrado un vínculo entre niveles de acetaldehído y catecolaminas en individuos asiáticos con respuesta de “flushing” durante la intoxicación alcohólica (**Mizoi Y 1979**) y en blancos tratados con inhibidores de la ALDH. Respecto a los neuropéptidos, se ha demostrado que el acetaldehído es capaz de promover la liberación de beta-endorfinas en cultivos celulares hipotalámicos (**Pastoric M 1994**), además se ha observado que la naloxona inhibe el “flushing” producido por la clorpropamida (**Eriksson CJP 2000**). Este dato resulta de mayor interés por cuanto diferentes autores han intentado poner en relación el reforzamiento y la recompensa de diferentes sustancias de abuso (entre ellas el alcohol/acetaldehído) con las beta-endorfinas (**Gianoulakis C 1996**). La propuesta de que el acetaldehído pueda estar implicado en las reacciones de

euforia, supone la posibilidad de que el propio acetaldehído esté promoviendo el abuso de alcohol lo cual ha sido estudiado por algunos autores (**Rood-Henricks ZA 2000, Quetermont E 2001**). No obstante existen numerosas reticencias a aceptar la hipótesis del acetaldehído como agente responsable de algunos efectos conductuales del etanol, debido a los problemas teóricos que se plantean, entre ellos que el acetaldehído derivado del metabolismo del etanol es difícilmente detectado en sangre tras un consumo normal y además penetra difícilmente a través de la barrera hematoencefálica (**Hunt WA 1996**). Se necesitan altos niveles de acetaldehído en sangre, incluso mayores de los encontrados tras un consumo muy elevado, para poder detectarlo en líquido cefalorraquídeo o en tejido nervioso (**Deitrich RA 1987**). Algunos autores defienden la hipótesis de que el acetaldehído se formaría en el propio Sistema Nervioso Central (SNC), demostrando la existencia de una ruta mediada por las catalasas en el mismo SNC (**Gill K 1992**). Este acetaldehído del SNC intervendría en los efectos euforizantes a través de su interacción con los sistemas de neurotransmisión de las conductas motivadas. Para ello el acetaldehído formaría algún compuesto de mayor complejidad estructural, formando aductos con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (**Jennet RB 1989**), incluso con catecolaminas (**Núñez-Vergara LJ 1991**). Este tipo de compuestos si presenta una estructura más compleja que posibilitaría la estereoespecificidad con receptores neurales. La unión de acetaldehído con catecolaminas formaría una serie de compuestos conocidos genéricamente como tetrahidroisoquinolinas (TIQs). En este sentido existen diferentes informes que parecen señalar que la administración intracerebral de TIQs pueden incrementar la preferencia por el etanol en ratas expuestas a situaciones de libre elección (**Myers WD 1982**), sin embargo otros autores refieren lo contrario (**Brown**

ZW 1980). Algunos autores sugieren que pudieran actuar como inhibidores competitivos de determinadas enzimas implicadas en la síntesis de las catecolaminas, como la MAO o la tirosín-hidroxilasa, también su implicación como precursor de diferentes compuestos con capacidad para actuar sobre los opiáceos endógenos, o como falsos neurotransmisores (**Deitrich RA 1987**). El acetaldehído además separa el fosfato de piridoxal (Vitamina B6) de su proteína transportadora, lo que contribuye a la degradación de la vitamina, esto se suma al consumo de vitamina B1 en el metabolismo del etanol, junto con disminución de la absorción de vitamina B12. El déficit de B6 reduce el Ácido Gamma amino butírico cerebral favoreciendo temblores y convulsiones. Estos síntomas citados, junto con hipoglucemia, hipovitaminosis B, contribuyen a la típica resaca o malestar del día siguiente, que es mayor en vinos con alto contenido en aldehídos y acetilos.

+ Otra vía metabólica, a la cual en los últimos años se le dá mayor importancia, es la oxidación del etanol en el retículo endoplásmico a través del llamado sistema oxidativo microsomal para el etanol (MEOS), que es similar al que participa en el metabolismo de fármacos, drogas y otras sustancias tóxicas para el organismo. La principal enzima de este sistema es la Citocromo P 450 (CYP450). La ADH es una enzima de baja Km, por tanto se satura fácilmente. Parece por tanto, que en situaciones de consumo elevado y crónico, otro sistema enzimático, el CYP450, el cual debe ser activado para que tenga lugar la eliminación hepática del etanol. El complejo CYP450 está constituido por una superfamilia enzimática involucrada en el metabolismo de esteroides, ácidos grasos, y sustancias tóxicas para el organismo, especialmente si son relativamente insolubles como los carcinógenos químicos, mutágenos y contaminantes ambientales

(**Djordjevic D 1998**). Se han descrito 74 familias, de las cuales 14 están presentes en mamíferos. Estas 14 familias comprenden a su vez a 26 subfamilias de las que 20 se han identificado en el genoma humano (**Lieber CS 1997, Upadhaya S 2000**). El CYP450 es un tipo de hemoproteína que se localiza en el retículo endoplásmico del hepatocito, es una enzima que presenta una elevada Km, siendo inducido por la administración crónica de etanol en hígado y otros tejidos (**Roberts BJ 1994, Upadhaya S 2000**). Cataliza reacciones de monooxigenación en las cuales el sustrato orgánico es hidroxilado a expensas del oxígeno molecular, de forma que transforma los sustratos para que sean más solubles en agua constituyendo, por tanto, una etapa importante en la detoxificación y excreción. La familia 2 del citocromo P 450 comprende al menos cinco subfamilias. Originalmente se la conocía como la “familia inducible por fenobarbital”, sin embargo se ha comprobado que la mayoría de los genes inducidos por este compuesto se encuentran principalmente en las subfamilias 2B y 2C. En la subfamilia CYP 2E se encuentra una enzima con un importante papel en el metabolismo del etanol: CYP2E1 siendo la principal enzima que interviene en la oxidación del etanol en la ruta no mediada por las deshidrogenasas. La CYP2E1 se localiza casi exclusivamente en la región centrolobulillar (perivenosa) donde es también predominante la lesión anatomopatológica en la hepatitis alcohólica aguda. Aunque se expresa de forma constitutiva en hígado y otros tejidos, determinados estudios (**Koop DR 1992, Takahashi T 1993, Hu Y 1995, Song BJ 1996**) han demostrado que en situaciones de ingesta crónica de etanol, la actividad CYP2E1 está notablemente elevada indicando que es un sistema inducible por etanol. Esta inducción está asociada con una oxidación del alcohol en los tejidos, y de este modo, parece estar ligada a la síntesis de acetaldehído (**Koop**

1992). El mecanismo por el cual el etanol induce esta enzima sigue siendo, por el momento, una cuestión no totalmente resuelta. Los datos experimentales avalan una inducción posttranscripcional mediante la estabilización de la proteína, al ser abolida la fase rápida de degradación de esta **(Roberts BJ 1994, Hu Y 1995)**. No obstante si el consumo de alcohol se prolonga en el tiempo, y especialmente si coincide con fases de ayuno, se ha observado una activación transcripcional del gen CYP 2E1 **(Hu Y 1995)**. Ambos mecanismos pudieran estar implicados en el metabolismo en pacientes alcohólicos, porque en dichos pacientes se ha observado un aumento de la proteína hepática 2E1 a la vez que en el ARNm **(Takahasi T 1993)**. La contribución del MEOS al metabolismo general del etanol es escasa en situaciones de administración aguda, en torno al 3-8%, sin embargo cuando los datos se refieren a los niveles de eliminación de etanol tras una administración crónica, estos valores alcanzan más del 22% **(Hu Y 1995, Song BJ 1996, Upadhy S 2000)**.

La capacidad de un individuo para metabolizar el alcohol depende de la funcionalidad de sus sistemas enzimáticos de ADH, ALDH y MEOS, así como de la disponibilidad de NAD, producida por oxidación de NADH. Se conocen diferencias entre las razas en cuanto a la existencia de isoenzimas de ADH y ALDH, que parece justificar el mayor efecto del etanol sobre los orientales, entre estos polimorfismos, cabe destacar la variante inactiva de la isoenzima ALDH2, cuyos portadores tienen disminuida la capacidad metabolizante del etanol. Las diferencias en la velocidad oxidativa pueden originar niveles de acetaldehído intolerables para el individuo. Otros factores que influyen en el metabolismo del etanol son: el ayuno forzado que retrasa su eliminación, la vitamina C que aumenta la velocidad de oxidación, el aumento de progesterona

y lactancia que aumenta su velocidad de eliminación, el consumo crónico aumenta la actividad de los sistemas oxidantes y de la NADH, así como induce el sistema MEOS. La administración de vitaminas de tipo B al intoxicado no afecta a la alcoholemia, sino al déficit vitamínico citado y a la sintomatología del sistema nervioso y neuromuscular.

1.2.4 Efectos del alcohol en la fisiología humana

El alcohol etílico es tóxico para la mayoría de los tejidos del organismo. Su consumo crónico y excesivo se ha asociado al desarrollo del síndrome de dependencia al alcohol, pero también a numerosas enfermedades inflamatorias y degenerativas que pueden llevar a la muerte. El paradigma de las lesiones orgánicas producidas por el consumo crónico de alcohol es la enfermedad hepática alcohólica (EHA) o hepatopatía alcohólica, si bien, las enfermedades producidas por dicho consumo afectan a todos los tejidos: sistema cardiovascular (miocardiopatía alcohólica), páncreas (pancreatitis aguda o crónica), sistema nervioso central (encefalopatías), nervios periféricos (polineuropatía alcohólica), sobre el feto (síndrome fetal alcohólico), además de producir enfermedades psicoorgánicas (amnesia lacunar, demencia alcohólica) y trastornos psicóticos.

El desarrollo de estas enfermedades depende en gran medida de la cantidad de alcohol consumido (dosis total acumulada durante la vida del sujeto), aunque se admite cierta vulnerabilidad genética y el concurso de factores ambientales e infecciones concomitantes por virus hepatitis B y/o C. Sin embargo consumido de forma esporádica sus efectos son reversibles, e incluso algunos estudios realizados durante la última década hablan de un posible beneficio cardiovascular consumido de forma dia-

ria a dosis bajas (**Hart CL 1999, Renaud SC 1998**).

Vamos a referirnos de forma resumida a los efectos fisiopatológicos del consumo **crónico** de etanol.

1. 2.4.1 Efectos del etanol sobre el aparato digestivo

A dosis bajas suelen tener pocos efectos, mientras que a dosis más elevadas dan lugar a una variedad de trastornos, (**Burbige EJ 1984**) de forma resumida:

-Efectos sobre el esófago: aumento de presión en esfínter esofágico inferior, aumento e la amplitud de ondas peristálticas con disfagia en tercio medio del esófago, disminución de la presión del esfínter esofágico superior favoreciendo la aspiración de contenido gástrico.

-Efectos sobre el estómago: Gastritis aguda y crónica, inhibición de la secreción ácida del estomago. No hay clara evidencia de que el etanol cause úlceras pépticas, disminución del vaciado gástrico.

-Aumento de la motilidad en el intestino delgado

-Efectos sobre el páncreas: modifica la secreción pancreática, favorece la pancreatitis aguda o crónica (**Singh M 1990**).

1. 2.4.2 Efectos del etanol sobre el sistema cardiovascular:

El consumo excesivo y crónico se ha relacionado con patologías graves y entre ellas:

-Miocardiopatía alcohólica

-Hipertensión arterial

-Arritmias y muerte súbita

-ACV

Sin embargo algunos artículos en los últimos años sugieren que el consumo moderado de alcohol reduce la mortalidad global y muy especialmente la debida a cardiopatía coronaria.

Varios estudios epidemiológicos han demostrado

que las curvas de riesgo de mortalidad en función del consumo de alcohol tienen forma de U o de J de modo que las personas abstemias tienen un riesgo mayor de muerte que aquellos que beben de forma ligera una cantidad diaria entre 2-4 UBES/día de alcohol (**Gronbaek M 2000**). también hay estudios en los que se ha diferenciado el tipo de bebida alcohólica, observando los efectos beneficiosos del vino tinto por su poder antioxidante sobre otro tipo de bebidas alcohólicas (**Renaud SC 1998**). Estos efectos del alcohol sobre el sistema cardiovascular se han atribuido a los siguientes mecanismos:

-Aumento del HDL colesterol

-Reducción de la capacidad de oxidación de las partículas de LDL-Colesterol

-Disminución de la agregabilidad plaquetaria y del fibrinógeno

-Cambios en el endotelio vascular que modifica la síntesis de óxido nítrico que causa vasodilatación y reducción de la síntesis de las moléculas de adhesión monocitarias y endoteliales que participan en los primeros estadios de la arterioesclerosis.

Sin embargo también se ha señalado que la menor mortalidad y el menor riesgo de cardiopatía coronaria en los grupos señalados podría deberse a que estos sujetos tienen hábitos de vida más saludables, como fumar menos, ejercicio físico, dieta mediterránea, y no al posible efecto cardiosaludable del etanol.

1. 2.4.3 Efectos del alcohol sobre el SNC:

Además de los conocidos, de la intoxicación aguda, hay otros menos conocidos como son:

-Efectos sobre la electrofisiología cerebral: Los alcohólicos crónicos presentan una reducción de determinadas ondas y una prolongación de otras en investigaciones sobre potenciales evocados auditivos (**Keenan JP 1997**).

-Efectos sobre el metabolismo cerebral: El etanol reduce la actividad del cortex occipital, mientras que aumenta la del cortex temporal izquierdo y ganglios basales izquierdos. Este patrón es similar al observado en sujetos en tratamiento con benzodiazepinas.

-Efectos sobre la circulación cerebral: Con técnicas de tomografía computerizada por emisión de fotón simple, SPECT se ha observado una reducción global del flujo sanguíneo cerebral en todos los lóbulos comparados con los controles **(Nicolas JM 1993)**. Esto podría explicar la demencia alcohólica.

1. 3) EL ALCOHOL Y SU REPERCUSIÓN EN LA SALUD

Diversas enfermedades y problemas de salud han sido ampliamente relacionados con el consumo de alcohol, tanto de forma crónica como aguda, con importante morbilidad, entre las que cabe destacar: la "EHA" (4% de hepatópatas alcohólicos en España), otras enfermedades: gastritis, pancreatitis, cánceres de diversas localizaciones, afecciones del sistema nervioso, miopatías, cardiopatías, alteraciones inmunitarias, alteraciones de la reproducción y sobre el desarrollo de la descendencia **(Lieber CS 1994, Bilir BM 2000, Caballería J 2000)**. Vamos a referirnos de forma resumida a diversos efectos a nivel orgánico y psíquico producidos por el alcohol:

1. 3.1 Efectos del alcohol sobre el comportamiento: tolerancia y dependencia

El consumo de alcohol al igual que otras drogas conlleva la necesidad de conocer una serie de conceptos teóricos:

-Drogodependencia: Compulsión a obtener la droga.

-Tolerancia: Incremento progresivo de dosis para

obtener el efecto que le produjo la dosis inicial.

-Dependencia: Cambios inducidos por una droga cuya supresión acarrea trastornos psicológicos o fisiológicos susceptibles de desaparición cuando la droga vuelve a ser administrada.

Los efectos psicológicos y sobre el comportamiento de cualquier fármaco dependen de la dosis, de su velocidad de distribución en el plasma, de la presencia simultánea de enfermedades o de otras sustancias y de las experiencias con el agente. Con el alcohol, hay que considerar si la observación se produce durante el aumento (cuando los efectos son más intensos) o durante la disminución de los niveles de etanol en sangre.

La "intoxicación legal" requiere una concentración de alcohol en sangre igual o superior a 0.5 gr/l, los cambios cognitivos y psicomotores se observan con concentraciones más bajas **(Granda MJ 1998)**, en torno a 2 UBES. La narcosis o sueño profundo se induce en muchas personas con el triple de la intoxicación legal, y la muerte incluso sin el empleo de drogas concomitantes puede darse con concentraciones de etanol en torno a los 30 UBES. El etanol, sólo o combinado con fármacos como las benzodiazepinas, se cree que es responsable de una gran parte de las muertes por sobredosis y si a ello se le suman los accidentes de tráfico constituye la droga más letal de la sociedad actual. Los mecanismos de acción del etanol en el SNC no se conocen del todo **(Granda MJ 1998)**, porque incluso dosis moderadas alteran simultáneamente muchos neurotransmisores y aumentan la fluidez de las membranas de las neuronas. Después de una exposición repetida la alcohol, el organismo establece una compensación de tres formas para tolerar concentraciones cada vez más altas de etanol:

1º Después de una o dos semanas de consumo diario de alcohol, el hígado puede aumentar la tasa metabólica de etanol en un 30%, es lo que se conoce como TOLERANCIA METABÓLICA O FARMACOCINÉTICA.

2º Cambios neuroquímicos complejos en las membranas celulares con alteración del flujo de iones originan la llamada TOLERANCIA CELULAR O FARMACOLÓGICA, la cual contribuye a la dependencia física.

3º Incluso con las mismas concentraciones de alcohol en sangre, el organismo puede aprender a adaptar el comportamiento y a funcionar mejor de lo que esperaba bajo la influencia de la sustancia, es la llamada TOLERANCIA DE COMPORTAMIENTO, con la falsa impresión en caso de conducción de automoviles de mayores reflejos que los habituales.

Una vez que las células se han adaptado a la exposición crónica del etanol, los cambios estructurales o bioquímicos no vuelven a la normalidad en caso de abstinencia en semanas o meses. La persona se convierte físicamente en adicta al alcohol. Esta situación física es distinta de la dependencia psicológica, un concepto mal definido, que indica que la persona está a disgusto sin la ingesta diaria de alcohol.

1. 3.2 Etanol y alteraciones nutricionales

Un gramo de etanol tiene aproximadamente 7 Kcal, una copa entre 70-100 Kcal y unas 10 copas 1000 Kcal, pero carecen de valor nutritivo como minerales, vitaminas y proteínas. Cualquier vitamina que se absorbe en el intestino delgado, puede ser deficitaria en los alcohólicos. Entre ellas cabe citar el ácido fólico, la piridoxina o vitamina B6, la tiamina o vitamina B1, el ácido nicotínico o niacina, la vita-

mina A. La carencia de estas vitaminas causan directa o indirectamente diversos síndromes clínicos, algunos de ellos con resultado de muerte debido a sus complicaciones.

El consumo de alcohol disminuye la concentración sanguínea de diversos iones: potasio, magnesio, calcio, cinc y fósforo. Esta disminución conlleva diversos efectos clínicos, y la influencia de los mismos en la producción de arritmias, puede llevar a la muerte.

Una dosis abundante de etanol en una persona sana, en ausencia de alimento, puede producir hipoglucemia transitoria entre 6-36 horas después, secundarias a las acciones del etanol en el metabolismo de la glucosa, como ya referimos previamente (**Pares A. 2002**).

En el etílico crónico se produce acumulo de cuerpos cetónicos, originando en ocasiones Cetosis alcohólica.

1. 3.3 Intoxicación etílica aguda

El alcohol etílico es el primer agente causal de intoxicaciones agudas en los servicios de urgencias de nuestro medio, constituyendo el 40% del total de pacientes intoxicados (**Montero FJ 1996**). Sus efectos clínicos dependen de la concentración en sangre aunque con grandes variaciones individuales y según se trate o no de un paciente etílico crónico. Se distinguen tres formas clínicas de intoxicación etílica según los niveles de etanol en sangre:

-Intoxicación leve (0.5-1.5 gr/l etanol): Como consecuencia de la desinhibición de centros subcorticales, cerebelo, bulbo y médula, comienzan a aparecer síntomas de extroversión, euforia, comunicación, es lo que clásicamente se denomina "fase de exaltación de la amistad". En caso de conducción

de vehículos durante esta fase se produce una falsa sensación de mayor autodomínio y seguridad, que conduce a un incremento de los accidentes.

-Intoxicación moderada (1.5-3 gr/l etanol): Síntomas variables, desde aumento de la exaltación e incluso agitación y agresividad, hasta habitualmente disminución de reflejos, depresión, llanto, tristeza (**Minian E 1989**). En niños se puede producir la muerte en esta fase.

-Intoxicación grave (niveles > 3 gr/l): Se caracteriza por severa depresión respiratoria y del nivel de conciencia hasta el coma, pudiendo además aparecer complicaciones como hipoglucemia, hipotermia, convulsiones, acidosis y broncoaspiración. Puede llevar a la muerte. Si los niveles de etanol superan los 4 gr/l habitualmente conducen al fallecimiento (**Minian E 1989, Montero FJ 1996, Guerri C 2000**).

En caso de intoxicaciones moderadas e importantes, son frecuentes los traumatismos craneoencefálicos, originándose hematomas epi o subdurales, cuya clínica con frecuencia queda enmascarada por la propia intoxicación y constituye una causa de muerte importante en urgencias hospitalarias (**Montero FJ 1996**).

1. 3.4 Patología neurológica por etanol

1. 3.4.1. Amnesia temporal alcohólica

Además de los efectos que se han reseñado en el caso de intoxicación etílica aguda, esta puede producir una amnesia temporal, es decir, un episodio de olvido total o parcial de lo ocurrido durante la fase de intoxicación aguda. Este problema lo experimentan cerca del 30% de los varones al final de la adolescencia, la mayoría de los cuales no pasa a desarrollar problemas mayores (**Charness ME 1989**).

1. 3.4.2. Alteraciones del sueño:

El alcohol después incluso de pocas copas, hace disminuir drásticamente la latencia del sueño (ayudando a la persona a quedarse dormida) y deprime la fase REM del mismo al principio del mismo, seguido en ocasiones de rebotes de fase REM asociado a pesadillas. La consecuencia de todo ello es la fragmentación del sueño, con una alternancia más rápida de lo normal entre las fases del mismo, y una deficiencia del sueño profundo. El efecto conjunto suele originar despertares más repetidos y una sensación de sueño inquieto y falta de descanso.

1. 3.4.3. Neuropatía periférica alcohólica

La ingestión crónica de dosis elevadas de etanol puede originar neuropatía periférica en el 10% de los etílicos crónicos. Este síndrome se origina por falta de tiamina y efectos directos del alcohol y acetaldehído. Los principales síntomas son entumecimiento bilateral de extremidades, hormigueo, parestesias, sobre todo en porciones distales de extremidades inferiores, dolor en ocasiones moderado, a veces invalidante.

En el caso de la intoxicación aguda por etanol, son frecuentes las parálisis periféricas de extremidades superiores de tipo posicional, por compresión habitualmente de nervios periféricos como el radial, que suelen revertir espontáneamente en horas o en ocasiones en días (**Chad DA 2000**).

1. 3.4.4. Síndrome de Wernicke y Korsakoff:

Originan un florido y grave cuadro clínico. Su causa principal es la falta de tiamina, en individuos vulnerables (deficiencia de transcetolasa genética). Clásicamente los pacientes con Síndrome de Korsakoff presentan una amnesia profunda anterógrada (incapacidad para aprender cosas nuevas) y retró-

grada, alteración del razonamiento visuoespacial, abstracto y conceptual, siendo frecuentes las “confabulaciones” o historias inventadas, pero tienen un cociente intelectual normal. El deterioro de memoria reciente es desproporcionado respecto al nivel global de deterioro cognitivo. Aunque la mayoría son de comienzo agudo en asociación con parálisis del VI par y ataxia, lo cual constituye el Síndrome de Wernicke, algunos pacientes presentan un desarrollo gradual de los síntomas, secundario a episodios repetidos de falta de tiamina. El Síndrome de Wernicke responde con rapidez al tratamiento con tiamina, mientras que sólo el 25% de los pacientes con Síndrome de Korsakoff se recuperan completamente, quedando el resto con secuelas parciales o completas (**Butters N 1984**).

1.3.4.5. Degeneración cerebelosa:

Aparece en el 1% de los bebedores abusivos crónicos, asociada a desnutrición. Clínicamente se caracteriza por ataxia progresiva, nistagmo, alteraciones posturales.

1.3.4.6. Demencia alcohólica:

El etilismo crónico conduce a problemas serios de deterioro cognitivo, con alteraciones de la memoria reciente y remota, durante semanas o meses después de la ingesta de alcohol. Las funciones cognitivas se ven sumamente deterioradas, a veces de forma irreversible a pesar de la abstinencia, demostrándose en el TAC daño subcortical permanente, aumento del tamaño ventricular y cisternal. Constituye cerca de un 20% de las causas de Demencia (**Orgogozo JM 1997**).

1.3.4.7. Accidentes cerebrovasculares y alcohol:

Diversos autores señalan la asociación entre Accidentes cerebrovasculares y alcohol, especialmente en las primeras 24 horas tras su consumo excesivo

(**Altman J 1996, Hart CI 1999**).

1.3.4.8. Síndromes de privación alcohólica:

El alcohol es una sustancia depresora del SNC, con una intensidad de acción sobre el mismo variable en relación con múltiples factores. El Síndrome o síndromes de abstinencia alcohólica es una manifestación de la dependencia física del alcohol, que habitualmente se desarrolla en los bebedores crónicos, que, por decisión personal o inducida, o más frecuentemente por la presencia de un proceso intercurrente (traumatismo, infección, pancreatitis; hepatitis), interrumpen su ingesta de forma brusca. Ahora bien, no es necesario que la persona interrumpa el consumo de forma absoluta para que se produzca este cuadro, sino que la simple disminución de la concentración de alcohol en sangre ya puede originarlo. Los principales factores de riesgo para la aparición del mismo son: la privación previa, la coexistencia de enfermedades relacionadas con el alcohol, los traumatismos y el consumo excesivo y prolongado de alcohol (**Farfan A 1997**).

Para tratar de explicar como se desarrolla el Síndrome de Abstinencia alcohólica tenemos que recurrir a la fisiopatología del etanol. El etanol en concentraciones de intoxicación a nivel del SNC interfiere en la transmisión de ciertas neuronas, provocando en unas su excitación y en otras su depresión. De esta forma el etanol actúa como un inhibidor bioquímico inespecífico de la actividad del SNC. Los neurotransmisores que están implicados son los siguientes: ácido gamma amino butírico (GABA), glutamato, sistemas dopaminérgico y adrenérgico.

El GABA es el mayor inhibidor de la neurotransmisión del SNC y sus receptores, por el uso crónico del alcohol, están deprimidos. Cuando la droga se

suspende, es decir durante la abstinencia, los receptores GABA vuelven a ser funcionales y el SNC experimenta el reverso de este efecto, el proceso excitatorio se ve aumentado, mientras que el inhibitorio está reducido (**Farfan A 1997**). El consumo prolongado también provoca la inhibición de la actividad del sistema neurotransmisor del glutamato, que es el mayor neurotransmisor excitatorio del SNC, actuando sobre su ión regulador N-metil-D-aspartato (NMDA). La abstinencia de alcohol invierte la inhibición del receptor NMDA, provocando una mayor excitación del SNC (**Hall W 1997**).

Otros mecanismos se encuentran también estimulados durante el Síndrome de Abstinencia, entre ellos un incremento de la transmisión dopaminérgica, que podría ser responsable de las alucinaciones y de la transmisión noradrenérgica responsable de la hiperactividad simpática y del aumento de la secreción de cortisol (**Farfan A 1997**).

El Síndrome de abstinencia según su forma de presentación y curso clínico puede clasificarse en :

-Síndrome de Abstinencia Menor o Predelirium: Es el más frecuente, curas clínicamente con una combinación variable de los siguientes síntomas y signos: temblor distal, ansiedad, irritabilidad, insomnio, anorexia, náuseas, vómitos, disfunción del Sistema nervioso simpático con taquicardia, taquipnea, sudoración, midriasis e hipertensión arterial, con menor frecuencia alucinaciones. Los síntomas suelen comenzar en las primeras 12 horas de abstinencia, aumentando en intensidad en las primeras cuarenta y ocho horas, para posteriormente ir mejorando gradualmente y desaparecer en el plazo de una semana (**Gippini A 1990**). El temblor distal, la ansiedad y el insomnio pueden persistir meses. El 10-20% presentan crisis convulsivas generalizadas.

-Síndrome de Abstinencia Mayor o DELIRIUM TREMENS: Menos frecuente pero más grave. Aparece bruscamente o por agravamiento del cuadro menor, caracterizándose por confusión mental, desorientación, agitación, alucinaciones visuales típicamente zoópsicas, y con menor frecuencia auditivas o táctiles, disfunción severa del sistema nervioso simpático, siendo raras las crisis convulsivas. Comienza a las cuarenta y ocho o setenta y dos horas tras la interrupción de la ingesta, cediendo en el plazo de 7-10 días. La mortalidad oscila según las series entre el 5-10 % (**Gippini A 1990, Farfan A 1997**), por hipovolemia, desequilibrio electrolítico con arritmias o infección intercurrente.

El tratamiento se basa en restaurar el equilibrio hidroelectrolítico, vitaminas sobre todo tiamina y terapia sedante.

1.3.5 Patología Cardíaca y etanol:

Algunos estudios señalan los efectos beneficiosos de pequeñas dosis de etanol sobre un corazón normal (**Renaud SC 1998, Hart CL 1999, Gronbaek M 2000**). El etanol disminuye la contractilidad miocárdica y causa vasodilatación periférica, dando como resultado un suave descenso de la presión arterial y un aumento compensador de la frecuencia y gasto cardíacos. Un máximo de una copa de vino al día durante largos periodos de tiempo puede disminuir el riesgo de muerte cardiovascular, se cree que por incremento de HDL colesterol y de cambios en los mecanismos de coagulación. Sin embargo no podemos obviar los efectos perjudiciales que tiene el mismo, tanto en caso de intoxicación aguda, como en consumidores excesivos crónicos. Entre las principales patologías nos encontramos las siguientes:

1.3.5.1. Crisis hipertensiva:

A pesar de que el etanol en dosis bajas produce,

como hemos indicado, un descenso de la presión arterial, el consumo de más de dos copas diarias origina un aumento de presión arterial dosis-dependiente, que vuelve a la normalidad tras semanas de abstinencia, y por lo tanto en este sentido es un factor más de riesgo cardiovascular (**Beilin LJ 1992**). En caso de intoxicación alcohólica aguda se originan elevaciones importantes de la presión arterial dando lugar a crisis hipertensivas o incluso a emergencias hipertensivas, y siendo coadyuvante de otros procesos como fallo cardíaco o Accidentes Cerebrovasculares (ACV), sobre todo en jóvenes (**Aguilera MT 1999**).

1.3.5.2. Miocardiopatía dilatada:

El consumo crónico y excesivo de alcohol puede conllevar la aparición de esta miocardiopatía, con síntomas variables, desde arritmias hasta insuficiencia cardíaca con hipocontractilidad del músculo cardíaco y dilatación de las cuatro cavidades del corazón (**Thomas AP 1994, Fernandez-Solá J 2000**).

1.3.5.3. Síndrome del “corazón del día de fiesta”:

Asociado al consumo agudo o por encima de la ingesta habitual son frecuentes las arritmias cardíacas tanto auriculares como ventriculares, sobre todo la Taquicardia Supraventricular Paroxística, en personas sin cardiopatía previa conocida, y las Taquicardias o fibrilaciones ventriculares en consumidores excesivos, que conllevan en ocasiones la muerte súbita (**Koskinen P 1990, Kupari M 1998**).

1.3.6 Patología Psiquiátrica asociada al etanol

El alcohol es el “gran imitador” de enfermedades psiquiátricas (**Santo-Domingo J 2000**), y a su vez puede dar lugar a una serie de cuadros clínicos psiquiátricos, entre ellos:

1.3.6.1. Estados depresivos (Merikangas KR 1985)

1.3.6.2. Ansiedad (Kushner MG 1999)

1.3.6.3. Alucinosis alcohólica o paranoia alcohólica (Casas M 2002)

1.3.6.4. Intoxicación patológica o idiosincrásica:

Estado de gran agitación e incluso violencia, durante horas, que se observa tras ingestión de dosis muy bajas de etanol, con amnesia posterior del episodio. Se observa en personas con lesiones cerebrales graves o predisposición genética, y constituye una rara situación, que además conlleva dificultades médico-legales.

1.3.6.5. Tentativas o suicidios consumados (Berglund M 1998)

1.3.6.6. Trastornos de la conducta alimentaria

Según algunos estudios se asocian a anorexia en el 11% de mujeres y en el 0.2% de varones (**Higuchi S 1993**).

1.3.6.7. Ludopatía (Slutske WS 2000)

1.3.7 Otras patologías producidas por etanol

El alcohol de forma crónica se relaciona con:

1.3.7.1. Patología Hematopoyética:

Entre ellas destacan la anemia macrocítica, siendo el alcohol la causa más frecuente de macrocitosis aislada, (**Levine RF 1986, Lindenbaum J 1987**), anemia sideroblástica, anemias por déficit vitamínico sobre todo ácido fólico, leucopenia, granulocitosis tóxica y trombopenia. Además el alcohol disminuye la agregación plaquetaria.

1.3.7.2. Patología Genitourinaria:

Entre ellas destaca atrofia testicular, amenorrea, ginecomastia, pérdida del vello axilar y pubiano, disminución del tamaño ovárico, síndrome fetal por alcohol (**Gavaler JS 1987**).

1.3.7.3. Patología Musculoesquelética:

Entre ellas destaca por su carácter invalidante y recidivante la Miopatía alcohólica (**Fernandez S 1996**) caracterizada por dolor e hinchazón muscular intensos, aumento de creatinfosfocinasa (CPK) y a menudo mioglobulinuria e insuficiencia renal. Entre las alteraciones óseas destacan alteraciones en el metabolismo del calcio, relacionadas directamente con la osteoporosis sobre todo en el varón, mayor riesgo de fracturas debido a lo previo y a intoxicaciones agudas y sus consecuencias, sobre todo por accidentes laborales y automovilísticos, fracturas patológicas y osteonecrosis de la cabeza del fémur (**Peris P 1994**).

Un cuadro clínico poco conocido pero muy relacionado con el alcoholismo es la rabdomiolisis, caracterizada por elevación de CPK total, siendo su causa más frecuente la agitación del delirium tremens, pero puede también deberse a otras causas relacionadas con el etilismo crónico como miopatías, infecciones, traumatismos, y cuyo principal riesgo es el desarrollo de insuficiencia renal.

1. 3.7.4. Estigmas cutáneos por etilismo.

1.3.7.5. Alcohol y cancer

Se ha relacionado claramente el consumo crónico de alcohol con cánceres orofaríngeos (**Garro AJ 1990**), algunos lo relacionan con el de mama y pulmón (**Longnecker M 1994**).

1.4) ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA Y HEPATITIS ALCOHÓLICA AGUDA

1.4.1 Etanol y hepatopatía

La ingestión crónica y excesiva de alcohol es una de las principales causas de enfermedad hepática en el mundo occidental. Clásicamente la lesión hepática alcohólica comprende tres grandes formas: esteatosis o hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis. Es importante subrayar que no siempre existe una forma pura de lesión hepática, ya que carac-

terísticas de varias de ellas pueden hallarse en el mismo sujeto. Las tres se agrupan bajo el nombre de Enfermedad hepática alcohólica (EHA) o hepatopatía alcohólica. No se puede confiar en los signos clínicos para diferenciar entre las diversas formas de hepatopatía alcohólica, así pacientes con insuficiencia hepatocelular severa pueden presentar en la biopsia una esteatosis, HAA o cirrosis. De igual modo, los pacientes con una simple esteatosis hepática y aquellos con cirrosis hepática compensada pueden ser muy difíciles de distinguir desde el punto de vista clínico (**Mailliard Me 2001**). El diagnóstico de certeza del tipo de lesión es la biopsia hepática y el estudio histológico de la muestra. Las lesiones reconocidas histológicamente de hepatopatía alcohólica son las siguientes:

a) Esteatosis:

El hígado graso está presente en más del 90% de los bebedores de fin de semana y los bebedores crónicos excesivos (**Mailliard ME 2001**).

El depósito de grasa en el citoplasma de los hepatocitos es la lesión más frecuente que se observa, en mayor o menor grado, en la mayoría de los etílicos crónicos, como lesión única o acompañando a otras alteraciones más graves. Es la consecuencia de los cambios del metabolismo de los lípidos ocasionados por el alcohol. **Anatomía patológica:** La lesión elemental consiste en el depósito de vacuolas de grasa de distinto tamaño en los hepatocitos. Estas vacuolas se van uniendo progresivamente hasta formar una gran vacuola sin membrana que ocupa todo el citoplasma y desplaza al núcleo hacia la periferia de la célula. En ocasiones se asocia a daño celular y se produce una respuesta inflamatoria con participación de linfocitos y macrófagos, constituyendo los lipogranulomas. Se localiza preferentemente en las áreas centrolobulillares, aunque puede extenderse a todo el lobulillo (**FIGU-**

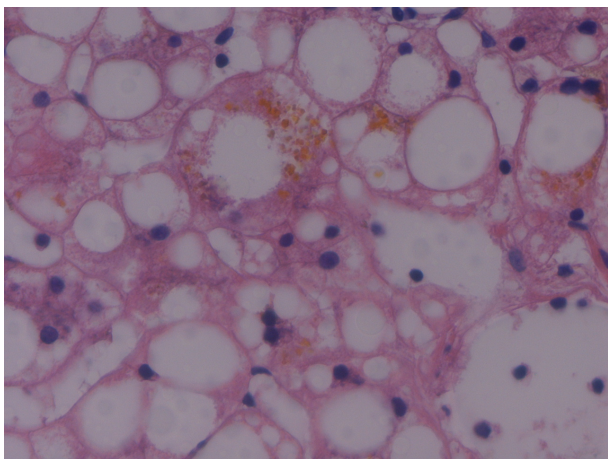


Figura 1.3. Esteatosis macrovacuolar, con rechazo o deformidad del núcleo del hepatocito. Abundantes gotas de pigmento biliar.

RA 1.3).

En los últimos años se ha descrito una forma especial de esteatosis en alcohólicos caracterizada por vacuolas de pequeño tamaño en el citoplasma que no desplazan al núcleo, denominándose esteatosis microvesicular alcohólica. Se distribuye con preferencia en los hepatocitos situados alrededor de la vena central y se acompaña de síntomas más floridos, con acusados trastornos del metabolismo lipídico. La esteatosis microvesicular suele ser el reflejo de un mayor daño celular y se asocia en ocasiones a hepatitis alcohólica aguda o a una colestasis más o menos intensa (**FIGURA 1.4**).

Clínica: La esteatosis hepática aislada suele ser asintomática y manifestarse por hepatomegalia indolora que disminuye con la abstinencia, acompañada de elevación pequeña o moderada de las transaminasas y de un hígado brillante y aumentado de tamaño en la ecografía. Algunos casos de esteatosis masiva pueden presentarse con manifestaciones de insuficiencia hepática grave, con descenso del tiempo de protrombina y encefalopatía hepática. Cuando la esteatosis se asocia a otras lesiones más avanzadas como fibrosis, hepatitis

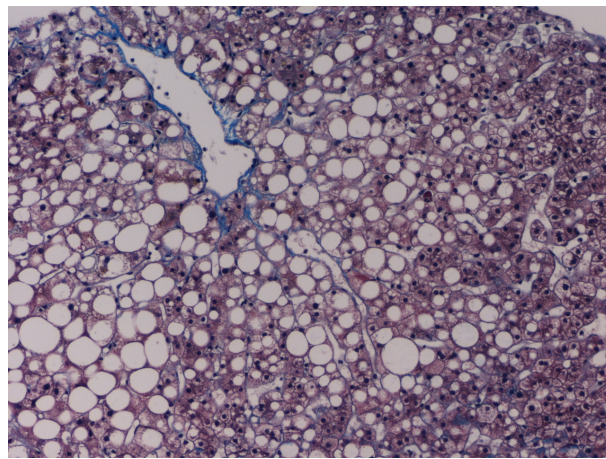


Figura 1.4. Esteatosis Macro y microvascular con campos en áreas periportales y colapso sinusoidal en portocentrales y colágeno en azul en área periférica de la vena centrolobulillar

alcohólica o cirrosis, las manifestaciones clínicas que predominan son las propias de estas últimas lesiones. La esteatosis microvesicular alcohólica suele asociarse a hepatitis alcohólica, presenta una sintomatología inespecífica como astenia, anorexia, vómitos y en ocasiones dolor abdominal. La hepatomegalia es constante y la ictericia frecuente, junto con el aumento de colesterol y triglicéridos, con descenso de actividad de protrombina (**Montull S 1989**).

b) Fibrosis:

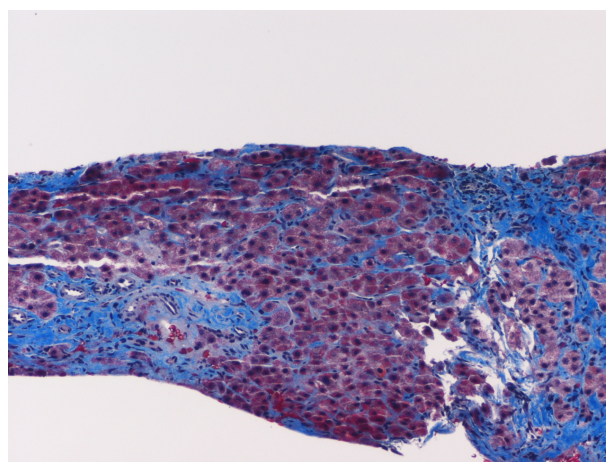


Figura 1.5. Fibrosis sobre hepatopatía alcohólica evolucionada. Fibrosis en campo central y colagenización difusa de paredes sinusoidales en azul teñida por anilina. No se observa esteatosis ni fenómenos inflamatorios.

En los alcohólicos crónicos se puede detectar un aumento en el número de células perisinusoidales y perivenulares relacionadas con la síntesis de colágeno, como las células de Ito y los miofibroblastos. Ello se asocia a un depósito de colágeno alrededor de las venas centrales y en los espacios de Disse alrededor de los hepatocitos centrolobulillares (**FIGURA 1. 5**).

Estas alteraciones se incluyen en el nombre de fibrosis perivenular y se considera que es una lesión de gran valor pronóstico que precede en un plazo de pocos años a la fibrosis septal y a la cirrosis en los alcohólicos que no dejan de beber. La fibrosis suele asociarse a un grado variable de esteatosis, y en algunos casos se acompaña de hepatitis alcohólica.

Las manifestaciones clínicas son más acusadas que en la estatoxis pero menos intensas que en la hepatitis alcohólica, suelen tener trastornos generales inespecíficos, hepatomegalia, y un número de casos pequeños dolor abdominal e ictericia.

La evolución de la fibrosis hepática es poco conocida, pero se considera que la fibrosis pericelular y el engrosamiento de la pared de las venas terminales podrían tener un papel importante en la progresión a cirrosis (**Takada A 1982**).

c) Hepatitis alcohólica aguda (HAA):

Aunque el alcohol está considerado como una hepatotóxica directa, sólo del 10-20% de los bebedores crónicos excesivos desarrollan HAA (**Mailliard ME 2001**), sin que todavía se haya explicado esta aparente paradoja.

Define unas alteraciones morfológicas que se asocian a manifestaciones clínicas muy variables.

Anatomía patológica: Se caracteriza por áreas de necrosis celular con un infiltrado inflamatorio constituido por polimorfos nucleares, de localización preferentemente centrolobulillar que es el patrón diagnóstico de HAA. **FIGURA 1.6.** En estas áreas

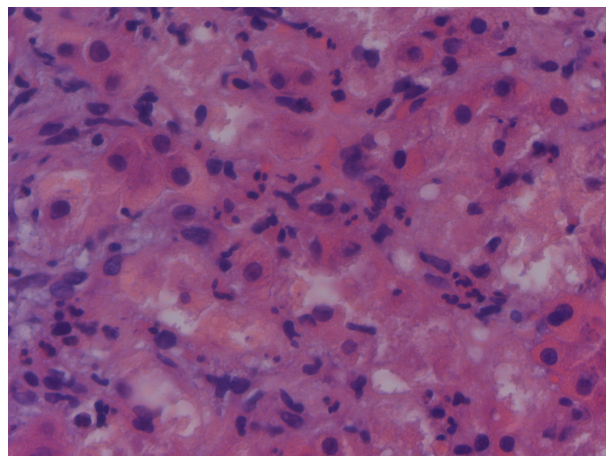


Figura 1.6. HAA con infiltrado de PMN con disposición lineal y hepatocitos alterados con lisis citoplásmica y Esteatosis micro y macrovacular. Además tractos fibrosos con PMN.

de necrosis los hepatocitos son grandes con un citoplasma claro y en su interior se puede observar material homogéneo, acidófilo, de localización perinuclear, que recibe el nombre de hialina de Mallory, y que están constituidos por agregación de fibrillas de naturaleza proteica. Además se observan megamitocondrias, fibrosis pericelular y perivenular central, así como colagenización del Disse y aparición de cuerpos de Councilman. (**Cabelleria J 2001**).

Estas lesiones pueden asociarse a esteatosis, fibrosis o cirrosis, siendo considerada un importante precursor de esta última.

Clínica: Su espectro clínico es muy amplio y va desde formas asintomáticas hasta otras fulminantes con insuficiencia hepatocelular. La forma más común es la que aparece en alcohólicos crónicos en el curso de intensificación de su ingesta o recaí-

da si han dejado recientemente de beber, presentando astenia, anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, ictericia y fiebre (**Caballería J 2000**). En casos excepcionales la fiebre puede persistir durante varias semanas. En los pacientes con considerable dolor abdominal, sensibilidad y fiebre a menudo es complicado el diagnóstico diferencial con colangitis o absceso hepático (**Bilir BM 2000**). En las formas más graves la hepatomegalia es dolorosa, la ascitis es frecuente, pudiendo desembocar en una insuficiencia hepatocelular con insuficiencia renal, llevando en muchas ocasiones al fallecimiento. En algunas ocasiones la HAA se manifiesta como una Colestasis intensa, de instauración brusca, simulando una etiología obstructiva. A veces se asocia a esteatosis masiva, hemólisis e hiperlipemia transitoria, constituyendo el Sde de Zieve. El aumento de los lípidos sanguíneos se produce a expensas de los triglicéridos, lo que explica el aspecto latescente del plasma. La mortalidad de la hepatitis alcohólica grave ronda 10- 26 % y en algunas series hasta el 60% (**Parés A 1986, Lindros KO 1995, O'Keefe C 2002**) en nuestro medio si bien varía según las series (**Tabla 1.12**).

Maddrey y cols. 1978	1/24	4%
Depew y cols 1978	8/15	53%
Theodossi y cols 1982	17/27	63%
Mendenhall y cols 1984	19/90	21%
Bories y cols 1987	1/24	4%
Carithers y cols 1989	2/35	6%
O'Keefe C y cols 2003	11/43	26%

Tabla 1.12: Mortalidad en diferentes series de HAA tras tratamiento con esteroides. Se ha reflejado la elevada mortalidad de la HAA en las series de las últimas décadas. Tomado de series diversas.

Las principales alteraciones de las pruebas de laboratorio en la HAA son la elevación de las transaminasas moderada o intensa, siendo la GOT superior a la GPT, y la GGT está muy elevada, siendo frecuente la asociación con colestasis. tam-

bién se observa con frecuencia leucocitosis con desviación izquierda, descenso de protrombina y trombopenia. En HAA grave se han reflejado las alteraciones bioquímicas principales en **Tabla 1.13**.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO EN LA HAA GRAVE	
Bilirrubina*	17.8 mg/dl
Albúmina	2.4 gr/dl
Protrombina *	47%
Leucocitos	15.700/mm ³
GOT	145 UI
GPT	36 UI
Creatinina *	1.3 mg/dl
Hemoglobina	10.8 gr/dl

Tabla 1.13: Media de valores obtenidos en 112 pacientes de dos estudios. Fuente: Universidad de Sureste de California 1998. *Valores considerados en estos estudios como factores pronósticos.

En pacientes con hepatitis alcohólica aguda leve que suspenden la bebida, puede haber recuperación completa con histología hepática normal o casi normal en 6 meses. En las formas moderadas puede haber marcada mejoría histológica, pero si continua su ingesta alcohólica lo normal es su evolución a cirrosis hepática con regeneración nodular, con complicaciones como encefalopatía hepática o varices esofágicas sangrantes (**Caballería J 2000**). Las mujeres con HAA pueden evolucionar a cirrosis a pesar de la supresión de la ingesta, hecho que no se observa en los varones (**Caballería J 2000**). La mortalidad se ha relacionado con anemia, leucocitosis, aumento de bilirrubina superior a 8 mg/dl, descenso de protrombina y aumento de creatinina. En la actualidad se barajan dos índices predictores de mortalidad a corto-medio plazo:

1º Función discriminante (DF): Se calcula mediante la fórmula:

DF= 4.6x (tiempo e protrombina-control (en segundos) + bilirrubina sérica (en mg/dl).

Se considera de mal pronóstico un valor superior a 32.

2º Mayo End-Stage Liver Disease (MELD) score:

Se calcula con la formula siguiente:

$$\text{MELD} = 3.8 \log_e (\text{bilirrubina total en mg/dl}) + 11.2 \log_e (\text{INR}) + 9.6 \log_e (\text{creatinina en mg/dl}).$$

Si es mayor de 11 la mortalidad es elevada en los siguientes 30-90 días tras la HAA (**Kamath PS 2001, Shet M 2002**).

Otros autores relacionan el peor pronóstico de la HAA con ascitis y bilirrubina superior a 8 mg/dl (**Shet M 2002**), encefalopatía hepática, sexo mujer, rechazo de esteroides, exceso de consumo junto con cirrosis, infecciones concomitantes (**Ichai P 2002, O'Keefe C 2002**).

d) Cirrosis:

La cirrosis alcohólica, clasicamente llamada de Laennec, se caracteriza por las mismas manifestaciones clínicas que la cirrosis de otra etiología aunque son más frecuentes las alteraciones ligadas al alcoholismo.

Anatomía patológica: Se caracteriza por la presencia de nódulos de regeneración rodeados de tejido fibroso que reemplazan a la estructura lobulillar normal. En los estadios iniciales, los nódulos son uniformes, pequeños, de unos 3 mm de diámetro, posteriormente aumenta su tamaño. Puede asociarse a lesiones de hepatitis alcohólica, que suelen ser más intensas en la periferia de los nódulos de regeneración.

Clínica: Clínicamente presenta las mismas manifestaciones clínicas que la cirrosis de otra etiología, junto con alteraciones ligadas al alcoholismo (**Parés A 1996**). En este sentido, son más evidentes los signos de desnutrición e hipovitaminosis,

los estigmas de etilismo/hepatopatía crónica etílica clásicos (**Tabla 1.14**).

Hipertrofia parotídea	Arañas vasculares
Labios finos y retintados	Telangiectasias
Boca séptica	Puntos rubíes
Eritema palmar	Dupuytren
Ginecomastia	Hiperpigmentación
Acropaquias	Perdida de vello axilar y pubiano

Tabla 1.14: Estigmas corporales de etilismo crónico/hepatopatía etílica.

Las manifestaciones extrahepáticas de alcoholismo crónico como polineuropatía, trastornos de la conducta o cuadros de abstinencia. En los análisis existe una hipertransaminemia, con elevado aumento de GGT, aunque los datos más sugestivos de cirrosis son el aumento de gammaglobulina, el descenso de la tasa de protrombina y una trombopenia como reflejo del grado de hiperesplenismo. La cirrosis puede permanecer asintomática, especialmente en los pacientes que dejan de beber. Cuando la enfermedad progresa aparecen los signos propios de hipertensión portal, como ascitis, circulación colateral y varices esofágicas acompañada o no de hemorragia digestiva. Cuando el grado de disfunción hepatocelular es muy marcado son frecuentes los episodios de encefalopatía hepática. Ante un deterioro muy marcado debe sospecharse la aparición de hepatocarcinoma. Se estima que el 75% de los pacientes con cirrosis alcohólica fallecen a causa de su hepatopatía y que entre el 10-20 % de los pacientes con cirrosis desarrolla un hepatocarcinoma. Las complicaciones de la cirrosis hepática son múltiples: ictericia, descompensación edemoascítica, encefalopatía hepática, hemorragia digestiva alta, síndrome he-

FACTORES PRIMARIOS	FENÓMENOS PATOGENICOS	FACTORES SECUNDARIOS
ACETALDEHÍDO	ESTRÉS OXIDATIVO	SEXO
DESEQUILIBRIO REDOX	INFLAMATORIO	VIRUS B Y C
RADICALES LIBRES	INMUNITARIO	NUTRICIÓN
ENDOTOXINAS	¿ PAPEL DE LAS MUTACIONES DE LAS ENZIMAS METABOLIZADORAS DE ALCOHOL ?	INMUNITARIOS

Tabla 1.15: Factores patogénicos conocidos y fenómenos de la patogénia de h.alcohólica y HAA.

patorrenal, peritonitis bacteriana espontanea, pancitopenia e hiperesplenismo, asociación a HAA. La supervivencia a los 5 años es del 70% en los que dejaron de beber y del 50% en los que no dejaron de beber, siendo menor en los que desarrollan HAA (**Parés A 1986, Parés A 2002**).

1.4.2 PATOGENIA DE LA HEPATOPATÍA Y HAA

La patogénia de la enfermedad hepática alcohólica es compleja y de su mejor conocimiento pueden derivarse medidas profilácticas y terapéuticas. No todos los alcohólicos desarrollan enfermedad hepática, incluso en condiciones similares en cuanto a cantidad y duración de consumo de etanol. Se estima que entre un 20-30% de bebedores crónicos excesivos desarrollan enfermedad hepática grave (**Cirrosis y HAA**) (**Encinas A 1997**). Se piensa por esta razón que el alcohol y sus metabolitos no son los únicos implicados en la patogénia de la H.alcohólica y HAA sino que intervienen otros factores que llamaremos secundarios.El progreso por tanto hacia la lesión hepática más allá del estadio de hígado graso parece precisar de factores de riesgo adicionales todavía no claramente definidos.

En la patogenia de la enfermedad hepática alcohólica intervienen los siguientes factores (**Tabla 1.15**):

Factores primarios:

1º ACETALDEHÍDO: Es el primer producto generado en la oxidación del etanol. Su hepatotoxicidad en el hígado del paciente alcohólico radica en la dificultad que éste presenta para su eliminación debido a:

- Las alteraciones mitocondriales presentes que condicionan una menor actividad de la enzima ALDH encargada de su oxidación.
- La disminución de glutatión y cisteína, que son sustancias antioxidantes.

Las consecuencias del aumento del ACETALDEHÍDO en el hepatocito son la unión a grupos tilo y amino de las proteínas con la consiguiente alteración de su funcionalidad, y la inducción de fenómenos de peroxidación de las membranas, provocando alteraciones en las mismas (**Lindros KO 1995**). El etanol produce una serie de efectos tóxicos sobre las membranas que ocasionan alteraciones morfológicas y funcionales en las distintas organelas del hepatocito como las mitocondrias, retículo endoplásmico y microtúbulos cuya consecuencia final es la necrosis celular (**Eriksson CJP 2000**).

El acetaldehído provoca alteraciones en el tráfico vesicular de proteínas tanto en los procesos de endocitosis como de secreción, estos fenómenos explicarían en parte, el aumento de tamaño y el abalonamiento de los hepatocitos, debido a la re-

tención intracelular de proteínas solubles que se asocia a un aumento de iones y agua para intentar mantener la presión oncótica. Así se une a las membranas plasmáticas, disminuyendo su fluidez, interfiere en el transporte mitocondrial, inhibe la reparación nuclear, afecta a los microtúbulos, forma complejos con distintas proteínas, lo que a su vez induce la formación de anticuerpos frente a estos complejos, activa el complemento, estimula la formación de superóxidos, aumenta la peroxidación lipídica y aumenta la síntesis de colágeno. El acúmulo de acetaldehído origina alteración de las funciones mitocondriales del hepatocito inhibiendo además la utilización de oxígeno y la síntesis de ATP. Además diversos estudios experimentales han demostrado que la administración prolongada de alcohol produce una depleción de glutatión y un aumento de la peroxidación lipídica por activación del sistema MEOS. Con el alcoholismo tiende a producirse hipertrigliceridemia debido a un incremento de las lipoproteínas séricas de muy baja densidad (VLDL), originando en ocasiones un suero lactescente, dolor abdominal y anemia hemolítica (Sde de Zieve).

2º Alteraciones del equilibrio REDOX (Encinas A 1997, Lieber CS 1997, Lieber CS 2000): A la desproporción NAD/NADH se la responsabiliza de multitud de trastornos metabólicos que se observan con el consumo crónico de etanol (**Lieber CS 1997**), entre los que se encuentran los siguientes como los más relevantes: (**Encinas A 1997, Lieber CS 2000**)

- Relación incrementada lactato/piruvato con hiperlactacidemia e hiperuricemia resultante.
- Disminución de la Neoglucogénesis, con hipoglucemia ocasional, sobre todo en bebedores crónicos excesivos.
- Cetosis, con una relación incrementada betahi-

droxibutirato/ácido acético.

- Oxidación reducida de ácidos grasos por la inhibición del ciclo del ácido cítrico, favoreciendo la acumulación grasa en el hígado (esteatosis hepática).
- Disminución de la capacidad del riñón de excretar ácido úrico, con lo que se produce hiperuricemia
- Alteraciones en el metabolismo del colágeno.

Hipoxemia (Maruyama S 1999).

3º Radicales libres: El metabolismo del alcohol origina una serie de radicales libres que provocan graves y múltiples consecuencias sobre el hígado:

- Peroxidación de las membranas lipídicas, con la consiguiente alteración en la función y estructura de las mismas.
- Alteración en el citocromo P 450.
- Repercusión en la síntesis de ácidos nucleicos, favoreciendo la carcinogénesis.

- Inducción de la expresión de ciertas citoquinas como el Factor de necrosis tumoral (FNT) o la Interleukina 8 (IL 8) que lesionan las mitocondrias y actúan sobre los neutrófilos respectivamente favoreciendo la lesión sinusoidal, e interviniendo también en la patogénia de la toxicidad hepática (**Felver ME 1990, Encinas A 1997, Lieber CS 1997**).

En la formación de radicales libres intervienen varias enzimas: **CYP2E1**, Acetaldehído oxidasa, xantinoxidasa.

4º Endotoxinas: Se ha demostrado la existencia, con frecuencia, de endotoxemia en los pacientes con hepatitis alcohólica aguda (HAA), por esos se ha intentado correlacionar el nivel de endotoxina con el daño hepático (**Bigatello LM 1987**). La hipótesis es que la absorción de las endotoxinas de las bacterias gram negativas, estaría aumentada en los pacientes alcohólicos, debido a que existe un aumento de la permeabilidad del intestino por el propio alcohol. Tras ser vehiculizadas por el sistema porta, las en-

dotoxinas alcanzarían el hígado y estimularían a las células de Kupffer para la liberación de citoquinas, cuyo papel ya ha sido expuesto (**McClain C 1993, Luster MI 1994, Thurman RG 1998**).

Factores secundarios:

1º Sexo: Está demostrado que las mujeres desarrollan enfermedad hepática severa de forma más rápida y precoz que los hombres, con una ingesta alcohólica menor y menos prolongada (**Parés A 1986, Saluspuro M 1999**). Las mujeres tienen un mayor riesgo de desarrollar niveles similares de lesión hepática consumiendo tan sólo de 3-4 UBES etanol/día durante 10 años, mientras que los hombres precisarían de 6-8 UBES alcohol/día en igual periodo.

Inicialmente este hallazgo se relacionó con el menor volumen de distribución de las mujeres (menor agua, mayor grasa corporal), que condiciona una mayor biodisponibilidad del etanol y mayor efecto tóxico. Pero las concentraciones de alcohol tras su administración intravenosa era similares lo que hacía suponer que el mayor potencial de lesión en las mujeres era condicionado por otros factores. Una de las alternativas era atribuir estas diferencias a factores hormonales, ya que las hormonas gonadales femeninas aumentan la actividad de la ADH y por tanto se generan metabolitos tóxicos con mayor prontitud y cuantía. Otra posibilidad podría ser la menor actividad de la ADH gástrica, es decir, un menor efecto de primer paso, con lo que la biodisponibilidad del alcohol estaría aumentada. Existen varios autores que apoyan esta hipótesis (**Encinas A 1997, Lieber CS 2000**). Se ha encontrado una menor actividad de esta enzima en mujeres alcohólicas respecto a hombres.

2º Virus de la hepatitis: La asociación de la hepatopatía alcohólica con los virus de la hepatitis B

(VHB) y C (VHC) es frecuente. En los alcohólicos con lesión hepática se ha encontrado una mayor prevalencia tanto de los marcadores VHB como de VHC, entre 5-10 veces más alta que en la población alcohólica sin Hepatopatía de control, si bien la epidemiología varía según el origen del estudio (**Poynard T 1997, Wiese M 2000**). Se ha observado que la abstinencia alcohólica hacía descender los niveles de RNA de VHC, diversos autores creen que los virus de la hepatitis B y C actuarían en la patogénia de la hepatopatía alcohólica favoreciendo el progreso de las lesiones y la carcinogénesis (**Parés A 1990, Cooksley W 1996, García Montes JM 1997**). La infección crónica por virus C es un importante factor de riesgo en la progresión y aceleración de la hepatopatía alcohólica según algunos autores (**Schiff ER 1997**). Los pacientes con lesión hepática alcohólica y VHC padecen una enfermedad hepática descompensada a una edad más joven, tienen unas tasas de supervivencia globales más bajas. Como consecuencia del solapamiento virus C y hepatopatía alcohólica, los pacientes pueden presentar una sobrecarga de hierro.

Por otro lado el alcoholismo condiciona una serie de alteraciones inmunitarias que favorecen la infección por estos virus. La existencia de infección por VHC se ha correlacionado con el desarrollo de hepatocarcinoma (**Lauer GM 2001**).

3º Alteraciones Nutricionales: En el paciente alcohólico suele existir un déficit nutricional más o menos importante (**Caballería J 1991, Caballería J 2001**) que puede ser:

-Primario: por déficit en la ingesta condicionado, de una parte, por el alto contenido energético del alcohol que desplaza a otros nutrientes, y de otra, por problemas socioeconómicos sobreañadidos en estos pacientes. La malnutrición primaria se debe

sobre todo a una dieta inadecuada, especialmente en relación a proteínas, lípidos y vitaminas, y a una mala utilización de las calorías. En los alcohólicos crónicos aunque la ingesta total de calorías puede ser normal o incluso elevada, la mitad de las mismas está ligada al alcohol y su valor energético es bajo. En efecto, en voluntarios sanos el valor del alcohol como fuente de energía es alto, ya que se oxida por la vía de la alcohol deshidrogenasa produciéndose NADH a partir del NAD que se utiliza para la síntesis del ATP. Por el contrario, cuando el consumo de alcohol es elevado, la mayor parte del NADH se utiliza para sintetizar ácido láctico y glicerofosfato en lugar de ATP. En estos casos, además está activado el sistema microsomal que en vez de utilizar los equivalentes reducidos para producir energía los utiliza para producir calor.

-Secundario: derivado de problemas de malabsorción. El alcohol produce una serie de trastornos que dan lugar a malnutrición, como son alteraciones en la digestión y absorción intestinal, alteración en el metabolismo de los nutrientes, disminución del almacenamiento hepático, aumento del requerimiento de nutrientes y aumento de las pérdidas urinarias y fecales.

Durante mucho tiempo se ha pensado que estas alteraciones eran las principales responsables de la lesión hepática en el alcohólico. Actualmente, no existe ninguna duda de la hepatotoxicidad directa del etanol a través del acetaldehído, no obstante también influyen en la misma.

Entre las deficiencias nutricionales más ampliamente descritas con relación a la patología de la hepatopatía alcohólica se encuentran:

-Déficit de colina: se ha relacionado con la esteatosis hepática.

-Déficit de metionina: en relación con la esteatosis

por un lado, y por otro con el daño mitocondrial, ya que la metionina es precursor de la S-adenosil-L-metionina que a su vez es precursor del glutatión. Por tanto se produce una disminución del glutatión mitocondrial, que es agente antioxidante, con lo que la susceptibilidad de las membranas lipídicas a los fenómenos peroxidativos está incrementada.

Déficit de vitamina A: produce activación de la fibrogenesis (células de Ito).

4º Alteraciones inmunitarias: En la hepatopatía alcohólica se han descrito diversas alteraciones inmunitarias, aunque no está claro si son causa o consecuencia de la enfermedad. La inmunidad celular se ve afectada al existir un menor número de linfocitos T circulantes y de linfocitos CD8, que migran hacia el hígado donde ejercerían un papel citotóxico. La hialina de Mallory y el acetaldehído son algunos de los antígenos que despiertan la respuesta citotóxica. La inmunidad humoral también resulta alterada: se producen anticuerpos contra la hialina de Mallory, contra la membrana alterada del hepatocito (LMA), y contra los complejos que forma el acetaldehído con proteínas. Se han encontrado inmunocomplejos contra cuerpos de Mallory (MB) en riñón de pacientes con HAA y en el 80% de los pacientes con HAA se han encontrado Anticuerpos antiproteína hepatoespecífica (LSP).

La IgA está aumentada en el suero de estos pacientes, con depósito en el sinusoides hepático. La IgA induce producción del factor de necrosis tumoral (TNF).

Se ha asociado HLA diversos con hepatopatía alcohólica:

HLA clase I hace posible el reconocimiento de antígenos foráneos por linfocitos citotóxicos (CD8). En

pacientes con HAA han sido demostrados en membrana hepatocitaria, células endoteliales de KUPFFER y de ITO (**Barbatis C, 1981**). En hepatitis alcohólica están aumentadas moléculas de Adhesión intercelular (ICAM) (**Burra P 1992**). Los HLA clase II hacen posible el reconocimiento de antígenos foráneos por linfocitos T helper o CD4. Se ha asociado con hepatopatía alcohólica: HLA-B8 en R.Unido, HLA-B13 en Chile, HLA-B40 en Escandinavia, HLA-A28 en Portugal (**Bailey RJ 1976, Meléndez 1979, Bell H 1983, Monteiro E 1988**).

También se han descrito los siguientes fenómenos inmunológicos en relación con hepatopatía alcohólica:

+Los monocitos y macrófagos liberan citoquinas, siendo las células de Kupffer macrófagos fijos.

+Los lipopolisacáridos de la pared de bacterias gram negativas son ENDOTOXINAS. Los cirróticos tienen mayores niveles de anticuerpos antibacterias intestinales. El consumo de etanol produce ENDOTOXEMIA (**Bode C 1987**). Así algunos autores (**Bigatello LM 1987**) demuestran endotoxemia sin sepsis en 36 de 39 cirróticos y se correlacionan con aumento de bilirrubina, encefalopatía y mortalidad. Además, la ingesta sobre todo crónica de etanol aumenta la permeabilidad intestinal para sustancias normalmente no absorbibles.

+La IL 1 está aumentada en la hepatopatía crónica moderada-severa (**McClain CJ 1999**).

+La IL 6 está aumentada en hepatitis alcohólica y se correlaciona con su curso clínico y con los marcadores de respuesta inflamatoria hepática en fase aguda como la proteína C reactiva.

+La IgA aumentada también estimula producción

de TNF e IL 6.

+La GSH es un importante regulador de la TNF, inhibiendo producción y liberación, lo cual se enmarcaría dentro de la llamada teoría de la lipoperoxidación.

+La Pg E2, también disminuida en hepatopatía crónica, desempeña la misma función.

+El alcohol per se no estimula la producción de Citoquinas proinflamatorias (**McClain CJ 1999**).

En la patogenia y en la progresión de la enfermedad hepática alcohólica existen tres fenómenos, interrelacionados entre sí y que hay que tener en cuenta a la hora de plantear nuevas estrategias terapéuticas, que son el estrés oxidativo, la liberación de citocinas proinflamatorias y profibrogénicas y el aumento de la síntesis de colágeno. La activación del MEOS, la activación de las células de Kupffer y de los neutrófilos, el hierro y los ácidos grasos poliinsaturados dan lugar a un estrés oxidativo con un aumento en la producción de radicales libres que produce una disfunción mitocondrial y favorece el desarrollo de fibrosis (**Lieber CS 1997, Friedman SL 1999, Lieber CS 2000**). Sin embargo, la consecuencia más importante del estrés oxidativo es una depleción de los sistemas antioxidantes como el glutatión, el tocoferol y el ácido ascórbico, lo que favorece la peroxidación lipídica y el daño celular. El propio alcohol y posiblemente la endotoxina producen una activación de las células de Kupffer y una mayor producción de citocinas proinflamatorias como la interleucina 8 y el factor de necrosis tumoral alfa y profibrogénicas como el factor transformante de crecimiento beta y la interleucina 6. Las células estrelladas desempeñan un papel fundamental en el proceso de fibrogenesis (**Friedman SL 1999**). Cuando existe daño hepático

co, las células estrelladas pierden sus depósitos de retinoides, se activan y se convierten en miofibroblastos capaces de sintetizar colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Los mecanismos responsables de la activación de las células estrelladas no se conocen del todo, pero en este proceso intervienen el acetaldehído, los productos finales de la peroxidación lipídica como el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal y varias citocinas y factores de crecimiento liberados por las células de Kupffer. Las células estrelladas una vez se han activado son capaces de proliferar y de mantener aumentada la síntesis de colágeno, así como de incrementar la síntesis de inhibidores de las colagenasas. En esta fase intervienen otras citocinas como el factor transformante de crecimiento beta y el factor derivado del crecimiento de las plaquetas.

En el metabolismo del etanol de alcohólicos crónicos un papel fundamental lo desempeña el Sistema MEOS, dentro de las teorías sobre la hepatopatía crónica una de las más importantes y aceptadas por muchos autores es la llamada TEORÍA DE LA LIPOPEROXIDACIÓN:

La oxidación del etanol por el sistema MEOS generaría radical SUPEROXIDO. El radical superóxido por acción de la superóxido-dismutasa genera PEROXIDO (OH) de HIDROPEROXIDOS. Estos inician la PEROXIDACIÓN por abstracción de H⁺ de los ácidos grasos polinsaturados de los FOSFOLÍPIDOS de membrana. El par enzimático GLUTATION OXIDASA-REDUCTASA se encarga del catabolismo de los HIDROPEROXIDOS (OH⁻). El glutatión reducido (GSH) es la biomolécula de defensa antioxidante (**Lieber CS 2000**). La ingesta aguda y sobre todo crónica de etanol DISMINUYE la concentración hepática de GSH por:

- El 20% pasa a glutatión oxidado.
- El glutatión pasa a plasma.
- El glutatión se conjuga con ACETALDEHÍDO.

Hay correlación entre LIPOPEROXIDACIÓN y niveles de GSH.

La ingesta crónica de etanol aumentaría la LIPOPEROXIDACIÓN por:

- +Inducción enzimática del SISTEMA MEOS, como el más importante.
- +Mayor acúmulo de hierro.
- +Nutrición deficitaria de vitamina E y aminoácidos.
- +La necrosis hepática centrolobulillar se correlaciona con MAYOR actividad microsomal y menor concentración de GSH.

A pesar de las evidencias sobre el efecto tóxico directo del alcohol y de las múltiples alteraciones metabólicas que produce en el hígado, deben existir otros mecanismos asociados capaces de explicar porque sólo un porcentaje relativamente pequeño de alcohólicos desarrollan una hepatitis alcohólica o una cirrosis hepática (**Parés A 1990, Lieber CS 2000**). En este sentido se han querido implicar factores genéticos como el sexo o los distintos polimorfismos de las enzimas implicadas en el metabolismo del alcohol, alteraciones inmunológicas y los virus de la hepatitis, especialmente el virus de la hepatitis C (**Parés A 1986, Caballería J 1991, Bilir BM 2000, Lieber CS 2000, Caballería 2001**). La patogénia de la HAA se diferencia de la de la cirrosis en los fenómenos inflamatorios de reclutamiento de leucocitos PMN y en el área de afectación hepática fundamentalmente.

En resumen, la patogenia de la enfermedad hepática alcohólica y de la HAA es muy compleja, con tres tipos de respuesta conjunta: autoinmunitaria,

fibrótica e inflamatoria. El tratamiento actual de la misma, aparte de la abstinencia de alcohol, debe basarse en estrategias capaces de corregir las deficiencias nutricionales y el estrés oxidativo, así como el ensayo de fármacos con una acción antiinflamatoria y/o antifibrogénica.

1.4.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS ENZIMAS DEL METABOLISMO DEL ALCOHOL: RELACIÓN CON ALCOHOLISMO-HEPATOPATÍA

1.4.3.1 Genética de las enzimas del metabolismo del etanol

Actualmente existen estudios epidemiológicos que ha mostrado cierta predisposición genética a la vulnerabilidad hacia el consumo de alcohol (**Yoshida A 1984, Iwahashi K 1995, Yamauchi M 1995, Shen YC 1997, Shea SH 2001**) si bien otros lo niegan (**Poupon R 1992, Vidal F 1993, Gilder FJ 1993**). En este sentido, han resultado de interés el análisis de modelos genéticos de etilismo con objeto de determinar si diferencias observadas en las tasas metabólicas de oxidación de etanol y la susceptibilidad a desarrollar hepatopatías pudieran deberse, en parte, a diferencias en las isoformas de las enzimas relacionadas con el metabolismo del etanol como consecuencia de mutaciones en los genes que las codifican. Las principales enzimas que intervienen en el metabolismo del alcohol son la Alcohol deshidrogenasa (ADH) y la Acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). En segunda línea interviene el citocromo P 450 (CYP 450). La acumulación del primer metabolito de la degradación del etanol, el acetaldehído, se relaciona con efectos importantes tanto en la intoxicación aguda como crónica, así como con el desarrollo de hepatopatía alcohólica como se ha descrito previamente. Diversos estudios han demostrado que estas enzimas son de expresión genética polimorfa, diferenciándose de cada una de ellas varios subtipos

(**Edenberg HJ 1992, Kitson KE 1996, Lieber CS 1997**). Investigadores japoneses han relacionado mutaciones de ALDH2 con hepatopatía alcohólica (**Higuchi S 1994, Li TK 2000**) y mutaciones de ALDH2 con protección frente al alcoholismo y al desarrollo de hepatopatía, debido a que dicha mutación da lugar a la síntesis de una proteína inactiva, originando un retraso en la oxidación del acetaldehído y desencadenando una reacción molesta ante su ingesta e incluso de aversión, quedando estos individuos protegidos frente al alcohol (**Xiao Q 1995, Li TK 2000**). también hay estudios, pero con escaso número de pacientes que relacionan diversas mutaciones con cáncer de orofaríngeos, colon y pancreatitis en pacientes etílicos (**Yokoyama A 1999, Murata M 1999, Maruyama K 1999**). La mayoría de los mismos se basa en muestras de sangre total pero no en biopsias hepáticas, y sobre todo en los polimorfismos de ALDH, siendo escasamente estudiados todavía los correspondientes a ADH y CYP 450 y menos aún en población europea (**Reich T 1998, Whitfield JB 1998, Pirmohamed M, 1995**).

1.4.3.2 Polimorfismos de Alcohol deshidrogenasa.

Esta enzima interviene como hemos dicho, en la ruta de oxidación del etanol, catalizando la primera reacción, la conversión del etanol en acetaldehído con la concomitante producción de NADH. Tiene gran capacidad oxidativa. La ADH hepática existe bajo múltiples formas. Las isoenzimas de la clase I son combinaciones homo y/o heterocigotas de subunidades α , β y γ codificadas por tres genes diferentes situados en distintos loci en el cromosoma 4: ADH1, ADH2 y ADH3 (**Edenberg HJ 1992, Kitson KE 1996**).

Se han descrito polimorfismos en el gen ADH2, dando lugar a tres subunidades β (ADH 2*1, ADH

2*2 y ADH 2*3) y en el gen ADH3 originando los tipos de polipéptido ADH 3*1 y ADH 3*2. El polimorfismo de 2*2 difiere tanto de ADH2*1 como de ADH 2*3 en la sustitución de un único aminoácido. La subunidad ADH 2*2 presenta en la posición 47 de la proteína un residuo de histidina en lugar de uno de arginina que aparece en el tipo normal (R47H). Por su parte, el polimorfismo ADH 2*3 difiere de los otros dos en la sustitución de un residuo de cisteína por uno de arginina en la posición 369 de la proteína Mutación R 369C) (**Burnell JC 1987**). Estas sustituciones en la cadena polipeptídica dan lugar a una grave alteración de las propiedades cinéticas de las isoenzimas. Así, el pH óptimo para la oxidación del etanol se modifica desde valores de 7.0 en ADH 2*2/ADH 2*3 hasta 10.5 en ADH 2*1/ADH 2*1, mientras que la constante de afinidad por el NAD⁺ y la velocidad máxima difieren en más de 70 y 40 veces, respectivamente, entre las diferentes isoenzimas (**Bosron WF 1986**). Estudios in vitro, realizados en condiciones casi fisiológicas de pH, temperatura y concentraciones de sustrato y producto han mostrado que la velocidad de oxidación del etanol en ADH 2*3/ADH 2*3 es entre 4 y 7 veces más rápido que la de ADH 2*1/ADH 2*1 (**Burnell JC 1987**). Estos resultados sugieren que, posiblemente estas diferencias cinéticas se vean también reflejadas in vivo. La ADH 2*1 es la mayoritaria en el mundo, la ADH 2*2 posee gran capacidad oxidativa, y predomina en Asia Oriental, la ADH 2*3 predomina en Africa y otros grupos étnicos (**Lieber CS 1997**). En lo referente a la subunidad γ , la isoforma ADH 3*2 difiere de la de ADH 3*1 en dos mutaciones puntuales: una sustitución de un residuo de glutamina por uno de arginina en el aminoácido 271 (Mutación Q 271R) y otra en un residuo de valina por uno de isoleucina en posición 349 de la proteína (Mutación V349I). Estas mutaciones, desde un punto de vista cinético, provocan una diferencia de aproximadamente el doble en la velocidad

máxima de oxidación del etanol. Diversos estudios señalan la capacidad protectora frente al alcoholismo de la ADH2*2 y ADH3*1 (**Bosron WF 1986, Muramatsu T 1995, Eriksson CJP 2001**). Algunos autores relacionan la presencia de ADH 2*1 y ADH 3*2 con alcohol dependencia y enfermedades relacionadas en población oriental (**Higuchi S 1994, Maezawa Y 1995**).

1.4.3.3 Acetaldehído deshidrogenasa (ALDH):

La ALDH mitocondrial interviene en el metabolismo del etanol catalizando la segunda reacción de la ruta, la oxidación, dependiente de NAD⁺, de acetaldehído a acetato. Aunque existen múltiples formas de ALDH en hígado, la enzima mitocondrial, codificada por el gen ALDH2 situado en el cromosoma 12 parece ser la principal responsable de la oxidación de la mayor parte de acetaldehído generado durante el metabolismo del etanol habida cuenta de la gran afinidad que muestra por su sustrato.

En el gen ALDH2 se han descrito dos polimorfismos que dan lugar a las subunidades activa e inactiva denominadas ALDH2*1 y ALDH 2*2 respectivamente (**Hsu 1986**). Ésta última, presenta una mutación en el aminoácido 487 de la proteína, una sustitución de un residuo de ácido glutámico por uno de lisina (Mutación E487K) (**Farres H 1994, Hsu 1986**). Aunque los dos alelos se expresan codominantemente, determinados estudios familiares han puesto de manifiesto que tanto los individuos heterocigotos como los homocigotos para ALDH 2*2 son deficientes por la actividad enzimática ALDH2, esto es, parece que la expresión del alelo ALDH 2*2 es dominante sobre el ALDH2*1 sugiriendo que cuando los dos productos están presentes, las dos subunidades forman heterómeros que desde el punto de vista catalítico son inactivos (**Xiao Q 1995**).

Adicionalmente, estudios in vitro han mostrado que la subunidad activa es mucho más estable, con una vida media de al menos 22 horas, frente a las 14 horas que presenta la enzima inactiva (**Xiao Q 1995**). En células que expresan ambas subunidades, se forman mayoritariamente heterómeros, cuya vida media es de 13 horas. Así, parece que el papel de la enzima inactiva en el número de recambio de moléculas es clave, indicando que el alelo ALDH2*2 ejerce su efecto dominante tanto interfiriendo con la actividad catalítica como provocando un incremento en el “turnover”.

Por último señalar, respecto a la vía de las deshidrogenasas, que el acetaldehído es el responsable de los molestos síntomas que se manifiestan después de la ingestión excesiva de alcohol (cefalea, palpitaciones, vómitos, sudoración...) y en el desarrollo de determinadas hepatopatías. La acumulación de acetaldehído presente en hígado y sangre después del consumo de alcohol, debe ser evaluada en base a las velocidades de su formación y eliminación, las cuales están reguladas por la acción conjunta de las tres enzimas.

En la literatura hay algunos datos contradictorios sobre estos genotipos:

-Con respecto al genotipo ALDH 2*1/2*1 la mayoría de los autores señalan su relación con la alcohol dependencia relacionándose además con: enfermedades relacionadas con el alcohol, problemas laborales relacionados con el alcohol, aumento del GGT en bebedores relacionados con este tipo (**Maruyama K 1999, Wall TL 1999, Takeshita T 2000**).

-Con respecto al genotipo ALDH 2*2/2*2 se ha señalado su papel protector frente al alcoholismo en población oriental (**Wall TL 1999**).

-Respecto al genotipo heterocigoto atípico ALDH 2*1/2*2:

-Varios estudios lo relacionan con aumento de riesgo de hepatopatía avanzada, otros con aumento de VCM en bebedores habituales, y también lo han relacionado con cánceres de colon, esófago y orofaringe (**Yokoyama A 1999, Murata M 1999**)

1.4.3.4 Citocromo P450 (CYP450):

El complejo citocromo P450 está constituido por una superfamilia enzimática involucrada en el metabolismo oxidativo de esteroides, ácidos grasos, determinadas drogas y sustancias extrañas al organismo, especialmente si son relativamente insolubles como los carcinógenos químicos, mutágenos y contaminantes ambientales. El CYP450 es un tipo de hemoproteína que se localiza habitualmente en el retículo endoplásmico en lugar de en la mitocondria. Cataliza reacciones de monooxigenación en las cuales el sustrato orgánico e hidroxilado a expensas del oxígeno molecular, de forma que transforma los sustratos para que sean más solubles en agua constituyendo por tanto, una etapa importante en la detoxificación y excreción.

Existen varios miembros de la familia CYP450, de los cuales el CYP2E1 es la principal enzima que interviene en la oxidación del etanol en la ruta no mediada por las deshidrogenasas. Participa aproximadamente en el 20% de su metabolismo a través de la actividad MEOS en el hígado (**Upadhyaya S 2000**). Determinados estudios han mostrado que en situaciones de administración crónica de etanol, la actividad CYP2E1 está notablemente elevada indicando que es un sistema inducible por el etanol (**Song BJ 1995, Hu Y 1995**): El gen responsable se ha denominado P 450IIE1, y está situado en el cromosoma 10. Se ha descrito varios polimorfismos genéticos que afectan al CYP2E1: el primero de ellos se localiza en la región anterior del extremo 5' del gen (**Hayashi S 1991**) .Da lugar a dos alelos: uno frecuente que se le conoce como c1 y

otro raro llamado c2. El alelo mutante c2 tiene una tasa transcripcional mayor que el alelo c1 (**Hayashi S 1991, Tsutsumi M 1994**) (**Mutación C2**) lo que parece estar relacionado con el desarrollo de determinados tipos de cancer. Se ha relacionado el genotipo c1/c1 con mayor susceptibilidad al desarrollo de cancer de garganta con una aparente asociación al hábito de fumar (**Li Z 2000**) y en la aparición de otros tipos de cáncer en el tracto aerodigestivo en grandes bebedores (**Bouchardy C 2000**). Un estudio realizado sobre población japonesa mostró que los sujetos con el alelo c2 de CYP2E1 y homocigotos para el genotipo ALDH 2*1 presentaban una mayor frecuencia de consumo excesivo de alcohol (**Sun F 1999**). En cualquier caso, desde un punto de vista genético parece evidente el papel que desempeñan los polimorfismos descritos en el metabolismo del etanol.

El conocimiento de estos polimorfismos y el establecimiento de un patrón genético de consumidores de riesgo y desarrollo de hepatopatía alcohólica, estudiándolo en sangre total y en muestras de biopsia hepáticas, permitiría una visión más exacta del problema y podría ser importante no sólo desde el punto de vista científico sino médico-legal.

1.5) POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE ENZIMAS DEL METABOLISMO DE ETANOL Y MARCADORES CLÁSICOS DE ALCOHOLISMO-HEPATOPATÍA

El consumo excesivo de alcohol constituye uno de los principales problemas de salud, sin embargo, paradójicamente el alcoholismo es un diagnóstico poco frecuente en nuestra actividad médica habitual. Ello se debe a varias razones: negación del consumo, ausencia de conciencia social del problema, falta de correlación entre los síntomas y consumo de alcohol, deterioro cognitivo con trastorno de memoria (**Clark WD 1981, Cirera E 1985,**

Conigrave KM 1995) Según algunos autores tan sólo un 30% de pacientes con problemas de alcoholismo son diagnosticados por el médico de atención primaria (**Clement S 1986, Cleary PD 1988**), siendo la mayoría diagnosticados cuando aparecen enfermedades relacionadas con el alcohol (**Casado MA 1996**). Incluso se ha detectado en centros de rehabilitación del alcoholismo la presencia de alcohol en orina en cerca del 50% de los que negaban su consumo (**Conigrave KM 1995**). El diagnóstico de alcoholismo crónico resulta difícil en los casos límite, en los que cabe un falso diagnóstico, lo cual no es de extrañar al no existir síntomas patognomónicos aislados. La complejidad conceptual de la enfermedad alcohólica entendida como una drogodependencia, comporta la implicación de trastornos físicos, psicoconductuales y sociales. Tradicionalmente el alcoholismo crónico es diagnosticado sobre la base de la historia clínica, test psicométricos, cuantía del consumo diario, y por último mediante pruebas de laboratorio: los llamados Marcadores biológicos del etilismo. Entendemos por Marcadores biológicos aquellos parámetros analíticos que nos dan información acerca de la existencia o no de un proceso patológico en el organismo. Clásicamente los marcadores de consumo/abuso de alcohol se han dividido en: Marcadores biológicos de estado y Marcadores biológicos de rasgo. Los primeros se caracterizan por modificarse en relación al patrón de consumo de alcohol, y han sido utilizados en la monitorización de los resultados del tratamiento y del curso de la enfermedad, ya que sus valores se normalizan con la abstinencia.

Los marcadores biológicos de rasgo se consideran estables en el tiempo, e independientes del consumo reciente o no de alcohol, y se han propuesto como marcadores indicativos de posible susceptibilidad-vulnerabilidad genética para el alcoholismo.

El marcador ideal del alcoholismo debería ser una prueba no invasiva, de bajo coste y de fácil realización en cualquier laboratorio, con elevada sensibilidad y especificidad, que permita diferenciar entre consumo de riesgo y excesivo de alcohol y que sirva tanto para el diagnóstico de alcoholismo como para el control de la abstinencia. Este marcador ideal no debería estar influido por el estado nutricional, y debería tener una vida media predecible. Los marcadores clásicos son buenos en relación con el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el alcohol, fundamentalmente la hepatopatía crónica, pero no son útiles en la detección de las primeras fases del consumo de riesgo, ya que se basan en la detección de las alteraciones que produce el alcohol sobre diferentes estructuras celulares, principalmente hematíes y hepatocitos. Estos marcadores tienen varios inconvenientes. De un lado indican la afectación de un determinado órgano, con lo que pueden dar falsos positivos cuando la afectación no se deba al consumo etílico, de otra parte, la sensibilidad de dichos marcadores aumenta cuando dichos órganos están suficientemente afectados y por tanto no son buenos marcadores en las primeras fases del alcoholismo, si son útiles en alcohólicos con enfermedad hepática alcohólica (**Conigrave KM 1995, Casado MA 1996**). Además los hallazgos de laboratorio pueden ser la forma inicial de presentación de la hepatopatía alcohólica y de la HAA: elevación de bilirrubina y/o transaminasas.

Los esfuerzos que se realizan actualmente van encaminados a desarrollar nuevos marcadores biológicos y test psicométricos que detecten el problema en sus inicios y que sean fiables en el seguimiento de la abstinencia.

1.5.1 Volumen Corpuscular Medio (VCM)

El VCM es una medida del volumen o tamaño de

los hematíes, y su principal uso es para clasificar las anemias. Se calcula dividiendo el hematocrito por la cifra total de hematíes. Los valores normales varían según la edad y sexo, siendo en los recién nacidos de 96-108 fl y en los niños y adultos de 80-95 fl. Cuando el VCM está aumentado, los hematíes son anormalmente grandes o macrocíticos. La macrocitosis ha sido un hallazgo común en pacientes con consumo crónico de alcohol, y ello se debe a una acción directa del alcohol en el desarrollo de los eritroblastos, más que a un déficit de ácido fólico. Es menos sensible (30-50%) pero más específica (65-100%) que la GGT. Existe una relación entre ingesta de alcohol y VCM, pero no tan clara como en la GGT. El VCM tarda alrededor de tres meses en regresar a niveles basales tras la abstinencia y también puede emplearse como control evolutivo del consumo o abstinencia de alcohol. Su especificidad en la comunidad es variable según las series, pero en general elevada. Sus principales inconvenientes son:

-Escasa sensibilidad en consumo entre 3-4 UBES/día en ambos sexos.

ALCOHOLISMO	HEPATOPATÍA	CIRROSIS BILIAR	DÉFICIT DE VITAMINA B12
RETICULOCITOSIS	ANTIEPILÉPTICOS	QUIMIOTERAPIA	TABACO
EDAD	MENOPAUSIA	MACROCITOSIS	

Tabla 1.16: Causas de aumento de VCM. Tomado de diversas fuentes.

-Incremento de los valores en otras circunstancias (**Tabla 1.16**), entre las que destacan hepatopatías de otro origen, anemia por déficit de ácido fólico, ésta última circunstancia habitual en pacientes con hepatopatía etílica, lo cual hace difícil saber si la macrocitosis es por el consumo crónico de alcohol o por la falta de ácido fólico.

Su elevación junto con la de la GGT indican casi siempre consumo de alcohol, siendo actualmente el criterio biológico más específico y de menor coste para el diagnóstico de consumo crónico de alcohol, en espera de nuevos marcadores. Su elevación conjunta permite identificar a más del 75% de bebedores crónicos.

1.5.2 Gamma-Glutamil-Transpeptidasa (GGT)

también llamada gamma-glutamyl-transferasa, es una glicoproteína que se encuentra en la fracción membranosa de varios tejidos. Las concentraciones más altas de esta enzima se encuentran en hígado, riñón, bazo y próstata. En menor cuantía se encuentra en páncreas, corazón y cerebro. La GGT está involucrada en el transporte activo de aminoácidos y aminos biológicas a través de la membrana hematoencefálica por la vía del ciclo de la gamma-glutamyl, del metabolismo del glutatión. Cataliza la transferencia de glutamato desde el glutatión o péptidos a aminoácidos formando gamma-glutamyl-péptidos. Varias isoenzimas de la GGT han sido aisladas y purificadas desde diversos tejidos pero no se les ha encontrado una aplicación clínica. Sus resultados normales en la mayoría de los laboratorios son inferiores a 50 U/l, sus valores normales son inferiores en mujeres menores de 45 años (5-30 U/l), y más elevadas en ancianos (hasta 60 U/l). La elevación se usa clásicamente para detectar la disfunción de las células hepáticas y revela con gran exactitud la existencia de colestasis. La GGT sérica es el marcador de laboratorio más ampliamente utilizado como test para abuso y consumo crónico de etanol. Según algunos autores es el marcador más sensible de consumo de alcohol pues es el primero que se eleva (**Rosalki 1984**). Numerosos autores han enfatizado su sensibilidad y especificidad en la detección del daño hepático alcohólico (**Rosalki S 1984, Stteter F 1991, Conigrave KM 199,**), siendo más sensible que las

transaminasas en la detección de consumo crónico y excesivo de alcohol elevándose en el 75% de estos pacientes (**Stteter 1991, Conigrave KM 1995**) independientemente de la presencia de afectación hepática. Es útil como marcador de la ingesta de alcohol, pues existe una buena correlación entre ingesta y niveles de GGT. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes:

CONSUMO DE ALCOHOL	OBESIDAD
CIRROSIS BILIAR	DIABETES
TUMORES BILIARES	PANCREATITIS
FÁRMACOS	INSUFICIENCIA CARDIACA
HEPATOPATIAS	TRAUMATISMOS GRAVES
SEPSIS	LITIASIS BILIAR
PERSONAS SANAS	

Tabla 1.17: Causas de aumento de GGT. Tomado de diversas fuentes.

- Se eleva en otras circunstancias (**Tabla 1.17**), destacando en el 25% de personas sanas no bebedoras, o bebedores crónicos de una comunidad cerrada (**Poupon RE 1989**).
- Su elevación es menor en edades inferiores a 30 años
- Su sensibilidad disminuye en mujeres que toman anticonceptivos, y sus valores disminuyen al final del embarazo (**Poupon RE 1989**).
- Suele elevarse más en consumo regular que en bebedores esporádicos
- Pierde utilidad como indicador de consumo si existe además hepatopatía, pancreatitis, enfermedad biliar, isquemia hepática de otro origen, insuficiencia cardíaca, administración de fármacos anticonvulsivantes, benzodiazepinas o anticonceptivos.
- Su principal desventaja es la baja sensibilidad en consumos inferiores a 6 UBES/día y según algunos autores también en grandes consumidores varo-

nes (**Kristenson H 1981**), siendo su especificidad mayor en la comunidad que en el medio hospitalario (90% vs 50%)

-Con la abstinencia, siempre que no exista hepatopatía, los niveles de GGT se reducen a la mitad en dos semanas, y vuelven a la normalidad en 6-8 semanas.

Entre sus ventajas destacamos dos:

1ª Es útil en el control de la abstinencia, más aún en combinación con la CDT y en programas de deshabituación alcohólica (**Kapur A 1989, Persson J 1991**).

2ª Tiene un importante papel pronóstico. Diversos autores señalan que los varones consumidores crónicos de alcohol con niveles de GGT superiores a 83 U/l al ingreso en el hospital tienen una mayor morbimortalidad que aquellos con valores inferiores (**Kristenson H 1987, Conigrave KM 1993**).

VALORES BIOQUÍMICOS	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %
GGT	30%	95%
GOT	52%	76%
GPT	38%	69%
VCM	33%	99%

Tabla 1.18: Eficacia de marcadores biológicos clásicos. Tomado de Casado MA 1996.

Su sensibilidad y especificidad en relación con otros marcadores vienen reflejadas en **Tabla 1.18**. Cuando los restantes marcadores presentan valores normales la elevación de GGT en principio indica consumo de alcohol.

1.5.3 Transaminasas

Son la aspartato amino transferasa (AST) o glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y la alanina amino transferasa (ALT) o glutamato piruvato transaminasa (GPT). Son las enzimas más frecuentemente analizadas en patología hepática y los marcadores más sensitivos de citolisis hepática. La GOT cataliza la transferencia reversible del grupo O-amino del

aspártico al grupo O-ceto del ácido cetoglutarico, cataliza reversiblemente la transferencia de un grupo amino del aspartato alfa-cetoglutarato para formar oxalacetato y glutamato. Su estabilidad a temperatura ambiente es mayor que la de la GPT. Altas concentraciones de GOT se encuentran en el músculo cardíaco, células musculares esqueléticas, hepatocitos, y en menor grado en páncreas y riñones. En el suero humano, la GOT está presente como dos isoenzimas distintas inmunológicamente: GOT citoplasmática (c-GOT) y GOT mitocondrial (m-GOT). La mayoría de la GOT humana en hígado es m-GOT, mientras que en el suero normal la mayoría es c-GOT (**Panteghini M 1983, Humbert M 1987, Schiele F 1989**). Sus valores normales oscilan en el adulto entre 5-40 U/l, algo menor en mujeres y hasta 50 U/l en ancianos. Elevaciones séricas de la GOT se encuentran en todo tipo de hepatopatías, como resultado de una anormal permeabilidad de la membrana hepatocelular y una salida de enzimas al plasma. El mismo mecanismo opera para la liberación de GOT desde otros tejidos como por ejemplo en un infarto agudo de miocardio desde el corazón, convulsiones desde el cerebro o desde el músculo esquelético en caso de traumatismo. Análisis en suero de c-GOT y m-GOT se emplean para valorar la severidad del daño hepático (**Schiele F 1989**), pues tienen un valor pronóstico, ya que su elevación se relaciona con cirrosis en los siguientes diez años. La GOT está elevada en el 45-75% de las personas consumidoras de alcohol (**Nalpas B 1986**). En consumidores crónicos de alcohol la elevación de GOT se acepta como indicador del daño hepático, si bien se puede encontrar en otras circunstancias como hepatitis de otro origen, síndromes mononucleosicos, hipotiroidismo, rabdomiolisis, enfermedades biliares. La GPT por si sola tienen poco valor pero el cociente GOT/GPT superior a 1 junto con elevación de GGT tiene una sensibilidad del 95% y una especificidad del 80% en la detección de recaídas alcohólicas, por lo que es útil en progra-

AUTORES	POBLACIÓN EN Nº DE CASOS	PRUEBA	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
SPENCER -PEET ET AL 1972	PACIENTES PSIQUIATRICOS (167)	AUMENTO GGT	83	88
MORSE Y HURT 1979	PACIENTES ALCOHÓLICOS (62)	AUMENTO VCM GGT GOT	26 63 30	-----
CHICK ET AL 1982	PACIENTES ALCOHÓLICOS Y POBLACIÓN LABORAL (522)	AUMENTO VCM+GGT	73	85
BERNADT 1982	PACIENTES PSIQUIATRICOS (385)	AUMENTO VCM GGT GOT GPT	20 69 41 43	99 87 98 93
PAPOZ 1981	ADULTOS SANOS BEBEDORES (995)	AUMENTO VCM + GGT	77	94
ECKHARDT ET AL 1981	PACIENTES (251)HOSPITALIZADOS	AUMENTO DE VCM+GGT	77	95

Tabla 1.19: Eficacia de los marcadores según diversas series.Tomado de fuentes diversas.

mas de deshabitación.Diversos autores han estudiado el cociente m-GOT/c-GOT como marcador de consumo crónico de alcohol en una población no seleccionada, mostrando que el cociente es una herramienta útil en el diagnóstico de consumo crónico de alcohol, con una sensibilidad superior a la de la GGT (**Nalpas B 1986**), si bien esto lo niegan otros autores (**Nilssen O 1992**).

Sus principales desventajas son las siguientes:

- Escasa sensibilidad en consumo inferior a 60 gr/día de etanol.
- Su modificación en situaciones fisiológicas: aumenta en el ejercicio y disminuye con el embarazo
- Elevación en diversas patologías: infarto agudo miocardio, pancreatitis, mononucleosis, rabdomiolisis, insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica, también por tratamiento con anticoagulantes orales,digital, salicilatos, verapamilo.
- Descenso en cetoacidosis diabética.

Por último señalar que diversos autores señalan el aumento de sensibilidad y especificidad de los marcadores clásicos cuando se utilizan conjunta-

mente, si bien estos estudios son de grupos diferentes y la mayoría en varones (**Tabla 1.19**).

1.5.4 Otros Marcadores

En la última década han comenzado a surgir nuevos marcadores biológicos del etilismo capaces de aportar información temprana del consumo de riesgo, del metabolismo del etanol y sus efectos tóxicos, destacando entre ellos la Transferrina Deficiente en Carbohidratos (CDT), la GOT mitocondrial, el 5-Hidroxitriptófano (5-HTO), sin embargo no hay estudios amplios de coste/eficacia lo cual permitiría su incorporación a la rutina del laboratorio general, permitiendo además el diagnóstico precoz y preciso del consumo de riesgo y alcohol/dependencia.

Los actuales marcadores de riesgo de consumo tienen una limitada sensibilidad y/o especificidad debido a que su estudio se ha basado en muestras de pacientes con dependencia alcohólica y continua existiendo controversia sobre la superioridad de los test psicométricos en la detección de consumidores de riesgo frente a las pruebas tradicionales de labo-

GRUPO DE BEBEDORES	M L	HOMBRES GRAMOS	UBES	ML	MUJERES GRAMOS	UBES
ABSTINENTES	0	0	0	0	0	0
LIGEROS	1 - 2 5	0.8- 20	1- 2	1- 25	0.8- 20	1-2
MODERADOS	2 6 - 7 5	21- 60	3- 6	26- 50	21- 40	3- 4
ALTOS	76-100	61- 80	7- 8	51- 75	41- 60	5-6
EXCESIVOS	101-150	81- 120	9- 12	76- 100	61- 80	7-8
GRAN RIESGO	> 1 5 0	> 120	>13	>100	> 80	> 8

Tabla 1.20: Tipología de Bebedores establecida por Ministerio de Sanidad y Consumo.Tomado de MSC 2002.

ratorio (**Spencer-Peet J 1972, Morse RM 1979, Papoz L 1981, Eckardt MJ 1981, Bernadt MW 1982, Wiberg A 1977**). Además cualquier forma de hepatopatía alcohólica (esteatosis, cirrosis, HAA) puede justificar los patrones bioquímicos anteriores (elevación GGT, GOT/GPT...), sin embargo la normalidad de dichos patrones NO excluye el diagnóstico de hepatopatía alcohólica, pudiendo ser el perfil hepático normal en la cirrosis hepática.

El conocimiento de la genética de las enzimas del metabolismo del etanol podría parcialmente obviar esto, pudiendo aplicarse a cualquier paciente consumidor de alcohol y sobre todo a los pacientes diagnosticados de hepatopatía alcohólica crónica y riegos de determinadas formas más graves como la HAA.

1.6) CONCEPTOS GENERALES

Se ha considerado importante definir lo que significan una serie de conceptos con cierta confusión en la literatura, ya que serán frecuentemente usados en el desarrollo del presente estudio. Entre ellos uno de los primeros conceptos que se ha depurado es al medida del consumo que se ha utilizado. Para facilitar el registro del consumo alcohólico y disponer de un lenguaje comparable, se recomien-

da por varios autores y por el European Alcohol Action Plan utilizar un sistema de unidades de bebida estándar (UBE) (**Lemmens P 1994, Rodríguez-Martos A 1999**). Una UBE sería el contenido alcohólico presente en determinados volúmenes de diferentes bebidas con una graduación estándar. A partir de un estudio de autores españoles (**Rodríguez-Martos A 1999**) se define la UBE en España. Una UBE global en nuestro país contendría unos 10 gr de alcohol puro (equivalente a una cerveza, un vaso de vino o media copa de destilados). El reflejo de los estudios sobre alcohol en UBEs facilita la anamnesis clínica, la encuesta epidemiológica y los mensajes preventivos. Distinguimos 6 clasesde bebedores en función de los consumos medios diarios de alcohol (**Tabla 1.20**).

Se ha utilizado escasamente el término alcohólico ya que implica una dependencia psíquica no valorada por los marcadores biológicos, siendo muchas veces utilizado de forma confusa en la literatura, puesto que puede incluir tanto a los bebedores moderados-importantes, como a los bebedores excesivos.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis.

En la literatura es conocido que no todos los sujetos bebedores excesivos crónicos desarrollan Enfermedad hepática alcohólica (EHA) ni todos los pacientes con EHA desarrollan hepatitis alcohólica aguda (HAA) (**Mailliard ME 2001**). En el diagnóstico de consumo de alcohol y de EHA los marcadores biológicos clásicos han desempeñado un papel relevante, al igual que los leucocitos, bilirrubina y la clínica del paciente en el diagnóstico y pronóstico de HAA, sin embargo están sujetos a limitaciones. Adicionalmente la patogénia de la HAA no está explicada en su totalidad en la actualidad. Ello hace necesario buscar nuevos marcadores que posibiliten no sólo el diagnóstico sino también que permitan explicar la patogénia de la HAA, además de posibilitar el consejo genético y por tanto el tratamiento preventivo. En este sentido se ha descrito que las mutaciones genéticas de ADH y/o ALDH y/o CYP 2E1 son más prevalentes en bebedores con hepatopatía alcohólica crónica que en población general, aunque los estudios son escasos y nada concluyentes sobre todo con respecto a CYP450 2E1 en población caucásica. Su relación con la HAA no ha sido estudiada. Se ha planteado la hipótesis siguiente: ¿podrían asociarse con HAA determinadas mutaciones genéticas de ADH y/o ALDH y/o CYP 2E 1?.

2.2 OBJETIVOS

1. Valorar la eficacia de los marcadores biológicos clásicos de etilismo y hepatopatía en una muestra de biopsias procedente de una población clasificada en tres grupos de pacientes a partir de la información proporcionada por dichas biopsias: abstemios con hepatopatía de origen no alcohólico, pacientes con hepatopatía alcohólica crónica sin HAA y pacientes con hepatopatía crónica alcohólica y HAA.
2. Determinar la frecuencia de mutaciones de ADH, ALDH y CYP P450 2E1 en las biopsias correspondientes a la población descrita.
3. Establecer criterios de asociación entre los polimorfismos genéticos de las enzimas del metabolismo del alcohol y HAA a partir del estudio de los mismos en las muestras de biopsias hepáticas correspondientes a la muestra de población descrita.
4. Establecer la eficacia de los polimorfismos genéticos como marcadores biológicos de HAA, así como tratar de explicar la patogénia de la HAA, a través de las implicaciones de las mutaciones genéticas de las enzimas del metabolismo del alcohol.

3. Metodología

3.1. Selección de pacientes. Clasificación

Se ha realizado un estudio en un total de 120 pacientes españoles procedentes de los Departamentos de Digestivo y Medicina Interna del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM). Los pacientes se clasificaron partiendo de la biopsia hepática de la siguiente manera:

- **GRUPO 1 o no bebedores:** (n= 56) (28 varones y 28 mujeres, edad media: 43,4 +/- 12,9)

+ Criterios de inclusión: Muestreo sistemático y consecutivo de pacientes abstemios que fueron biopsiados en el Departamento de Digestivo del HGUGM en dos periodos: Enero-marzo 2002 y enero-marzo 2003. El motivo de la biopsia fue el estudio de hipertransaminemia de origen desconocido o virus de hepatitis B o C positivo .

+ Criterios de exclusión:

1º Aquellos pacientes cuya muestra de biopsia no fue posible procesar .

2º Pacientes trasplantados hepáticos con biopsia postrasplante (e= 5) (e=excluidos).

3º Biopsias cuyo diagnóstico histológico era encuadrable en más de una categoría diagnóstica.

- **GRUPO 2 o bebedores sin HAA:** (n= 33) (27 varones y 6 mujeres, edad media: 48,7 +/- 9,3 .

+ Criterios de inclusión: Muestreo sistemático y consecutivo de pacientes biopsiados en el Departamento de Digestivo del HGUGM en los mismos periodos que los del grupo 1. Todos ellos con diag-

nóstico histológico de hepatopatía alcohólica en grado diverso (desde esteatosis leve-moderada a cirrosis) sin infiltrado inflamatorio agudo de polimorfonucleares en biopsia hepática.

+ Criterios de exclusión:

1º Biopsias cuyo diagnóstico histológico era encuadrable en más de una categoría diagnóstica.

2º *Pacientes cuya muestra de biopsia no fue posible procesar.

3º Pacientes trasplantados hepáticos que eran biopsiados postrasplante (e= 9).

- **GRUPO 3 o bebedores con HAA:** (n=32) (19 varones y 12 mujeres, edad media:46,1 +/-10,1).

+ Criterio de inclusión: Para la inclusión en este grupo se requirió la presencia de un diagnóstico histológico de HAA, definido fundamentalmente por la presencia de infiltrado polimorfonuclear, además de otras características no imprescindibles. Como degeneración hidrópica de los hepatocitos, presencia de hialina de Mallory y megamitocondrias. Muestreo consecutivo y revisión de la base de datos, de todas las biopsias realizadas en el Departamento de Digestivo entre los años 1995-Marzo del 2003 en el HGUGM .

+Criterios de Exclusión:

1º Biopsias cuyo diagnóstico histológico era encuadrable en más de una categoría diagnóstica

2º*Pacientes biopsiados tras trasplante hepático

3º*Pacientes con muestra insuficiente o inadecuada de biopsia para extracción de DNA. (e= 6)

Las características de las biopsias de los tres grupos reflejados en **Tabla 3.1**

BIOPSIA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	TOTAL
NORMAL	11			11
% dentro de biopsia	100 %			100%
% dentro de grupo	19,6 %			9,2 %
LEVE o grado 1	37	13	2	52
% dentro de biopsia	71,2 %	25 %	3,8 %	100 %
% dentro de grupo	66,1 %	39,4 %	6,5 %	43,3 %
MODERADA o grado 2-Otros*	3	6	3	12
% dentro de biopsia	25,2 %	50 %	25,0 %	100 %
% dentro de grupo	5,4 %	18,2 %	9,7 %	10,0 %
FIBROSIS –OTROS* o grado 3	2	8	5	15
% dentro de biopsia	13,3 %	53,3 %	33,3%	100 %
% dentro de grupo	3,6 %	24,2 %	16,1 %	12,5 %
CIRROSIS o grado 4	3	6	21	30
% dentro de biopsia	10,0 %	20 %	70,0 %	100 %
% dentro de grupo	5,4 %	18,2 %	67,7 %	25,0 %
TOTAL	56	33	31	120
% dentro de biopsia	46,7 %	27,5 %	25,8 %	100 %
% dentro de grupo	100 %	100 %	100 %	100 %

Tabla 3.1. Características de las biopsias de los tres grupos: Se ha especificado el porcentaje (%) tanto en el total de las biopsias como dentro de cada grupo, según grado de afectación hepática para lo que se ha seguido los grados especificados por el Departamento de A. Patológica del HGUGM (normal, grado 1 o leve, grado 2 o moderada, grado 3 o fibrosis, grado 4 o cirrosis. Otros*: La mayoría de los pacientes del Grupo 1 presentaban Hepatitis crónica activa (HCA) por virus C que se incluyen en los diferentes grados (HCA leve, moderada, severa o grado 3), siendo la mayoría HCA moderada o severa junto con fenómenos de esteatosis también clasificados por grados (esteatosis leve, moderada o grado 2 y severa o grado 3).

Para la validación de resultados se compararon los resultados previos con un **grupo externo o GRUPO 4:** Muestreo consecutivo de sujetos donantes de sangre del HGUGM en el período comprendido entre Enero-Marzo 2003 (n=72, 36 varones, 36 mujeres, edad media 38,7+/- 12,2). Se ha considerado como un grupo de validación externo, representativo de la población general, útil para comprobar las frecuencias de las mutaciones que se han estudiado. En este grupo no se han con-

templado los datos de consumo, al no estar incluidos dentro del cuestionario habitual de la donación de sangre. Los pacientes de este grupo fueron negativos respecto a Virus de Hepatitis B (VHB) y C (VHC).

Las características de los grupos de clasificación reflejadas en **Tabla 3.2**

TABLA 3.2	GRUPO 1 (n= 56) Pacientes con hepatopatía no alcohólica	GRUPO 2 (n=33) Pacientes con hepatopatía alcohólica sin HAA	GRUPO 3 (n=31) Pacientes con hepatopatía alcohólica con HAA	GRUPO 4 (n=72) Población general sana, donantes de sangre
Edad (años), media (D.S.)	43,4 (12,9)	48,7 (9,3)	46,1 (10,1)	38,7 (12,2)
Sexo, N (%)				
Hombres	28 (50,0)	27 (81,8)	19 (61,2)	36 (50)
Mujeres	28 (50,0)	6 (18,2)	12 (38,8)	36 (50)
Consumo de alcohol (UBES/día), N(%)				
0	56 (100)	0 (0)	0 (0)	-
3 – 8 (Hombres); 3 – 6 (Mujeres)	0 (0)	12 (36,3)	4 (13,0)	-
> 8 (Hombres); > 6 (Mujeres)	0 (0)	21 (63,7)	27 (87,0)	-
VHB positivo, N (%)	35 (62,5)	4 (12,1)	1 (3,2)	0 (0)
VHC positivo, N (%)	34 (60,7)	15 (45,5)	2 (6,4)	0 (0)

Tabla 3.2. Características de los grupos estudiados.

3.2. Variables estudiadas

En el presente estudio se han recogido en los grupos 1, 2 y 3 las siguientes variables que a continuación se desarrollan: Demográficas (edad y sexo), consumo de alcohol, bioquímicas, virus de hepatitis B y C, histológicas, genéticas (polimorfismos de ADH, ALDH y CYP 2E1). En el grupo 4 se han recogido las variables demográficas, virus de hepatitis B y C y genéticas.

3.2.1 Demográficas

Edad, edad media, género (sexo). Reflejadas en **Tabla 3.2**

3.2.2 Consumo de Alcohol

El consumo de alcohol se determinó en base al

concepto de Unidad de Bebida Estándar (UBE) (Rodríguez-Martos A 1999).

La obtención de datos relativos a consumos de etanol por día se ha realizado en la mayoría de los pacientes mediante dos métodos:

1º En pacientes vivos mediante entrevistas personales o telefónicas, a través de test psicométricos, fundamentalmente todo CAGE (Ewing JA 1984), así como de los datos contenidos en la historia clínica (Tabla 3.3).

Pregunta 1ª	¿ALGUNA VEZ HA SENTIDO LA NECESIDAD DE DISMINUIR SU CONSUMO DE ALCOHOL?
Pregunta 2ª	¿LE HA MOLESTADO QUE ALGUIEN CERCANO CRITIQUE SU CONSUMO DE ALCOHOL?*
Pregunta 3ª	¿SE HA SENTIDO ALGUNA VEZ CULPABLE DE BEBER TANTO?*
Pregunta 4ª	¿ALGUNA VEZ HA TOMADO UNA COPA PARA TRANQUILIZARSE O SUPERAR UNA RESACA?
PUNTUACIÓN	CADA RESPUESTA POSITIVA 1 PUNTO

Tabla 3.3. Test de CAGE: Es un método psicométrico de detección de alcoholismo considerándose positivo para consumo de alcohol si hay más de 1 pregunta positiva (CAGE POSITIVO>1).

2º En pacientes fallecidos o con imposibilidad de recogida de lo previo, se han obtenido los datos

relativos a consumo a partir de la historia clínica. En el presente estudio se han diferenciado 4 clases de bebedores en función de los consumos medios diarios de alcohol para ello se ha tomado como base la tipología de Bebedores establecida por Ministerio de Sanidad y Consumo (Tabla 3.4).

Para evitar una excesiva dispersión de los grupos se han unificado en el presente estudio a los bebedores moderados-altos, así como a los bebedores excesivos-gran riesgo.

Criterios de Exclusión: Individuos con tiempos de consumo inferiores a cinco años o consumo inferior a 3 UBES/día.

Los datos de consumo medio por grupos reflejados en Tabla 3.2.

3.2.3 Bioquímicas y hematológicas: determinación y parámetros para valorar su eficacia.

3.2.3.1 Determinación de Marcadores biológicos clásicos de etilismo

Se han determinado los marcadores biológicos clásicos de etilismo en los tres grupos de pacientes: transaminasas (GOT y GPT), GGT, VCM. La determinación analítica de estos marcadores se ha rea-

GRUPO DE BEBEDORES	M	L	HOMBRES GRAMOS	UBES	ML	MUJERES GRAMOS	UBES	
ABSTINENTES	0		0	0	0	0	0	
LIGEROS	1 - 2	5	0.8- 20	1- 2	1- 25	0.8- 20	1-2	
MODERADOS	2	6 - 7	5	21- 60	3- 6	26- 50	21- 40	3- 4
ALTOS	7	6- 10	0	61- 80	7- 8	51- 75	41- 60	5-6
EXCESIVOS	10	1-15	0	81- 120	9- 12	76- 100	61- 80	7-8
GRAN RIESGO	> 1	5	0	> 120	>13	>100	> 80	> 8

Tabla 3.4. Tipología de bebedores establecida por Ministerio de Sanidad y Consumo.(Fuente: Ministerio de Sanidad y Consumo 2002)

	VCM (fL)	GOT (UI/L)	GPT (UI/L)	GGT (UI/L)
Unidades/litro	94 fl para ambos	<37 para hombres <31 para mujeres	<41 para hombres <31 para mujeres	8-61 para hombres 5-36 para mujeres

Tabla 3.5. Valores de referencia de VCM, transaminasas y GGT del HGUGM en sus correspondientes unidades y diferenciadas por género.

lizado en el laboratorio de Bioquímica del HGUGM. Los valores de referencia que se ha empleado reflejados en **Tabla 3.5**

3.2.3.1.1) Transaminasas y GGT

Se han determinado las transaminasas (GOT, GPT) y GGT mediante una técnica de enzimo-inmunoensayo colorimétrico en un equipo Roche-Hitachi Molecular P. empleándose los valores de referencia descritos.

3.2.3.1.2) Volumen Corpuscular medio (VCM)

Los valores de VCM se han determinado en un contador hematológico Coulter Hens, empleándose unos valores de referencia de 80-94 fl. Se consideran los valores superiores a 94 fl como patológicos, resultado de la siguiente fórmula:

$VCM = \frac{\text{hematocrito (en ml/1000)}}{\text{hematíes (en millones/mm}^3\text{)}}$ (Casado MA 1996).

3.2.3.2 Determinación de valores hematológicos y bioquímicos de HAA

En el laboratorio del HGUGM se ha llevado a cabo la determinación de leucocitos y Bilirrubina (BR) en los grupos 2 y 3, para conocer sus valores en hepatopatía alcohólica crónica con y sin HAA.

3.2.3.2.1) Leucocitos

Los leucocitos se han determinado en el estudio que se ha realizado en un contador hematológico Coulter Hens. Los valores de referencia que se han

empleado son: 5.000-12.000 leucocitos/mm³ valores normales. Por encima o por debajo de estas cifras se han considerado en el estudio que se ha realizado como valores patológicos.

3.2.3.2.2) Bilirrubina (BR)

Los valores de BR se han determinado en un equipo Roche-Hitachi Molecular P. En el estudio que se ha realizado se han empleado los siguientes valores de referencia: $< 0 = 1,2 \text{ mg/dl}$ = valores normales.

3.2.3.3. Parámetros para valorar su eficacia

En el presente estudio se han determinado los porcentajes de la sensibilidad y especificidad de cada uno de los parámetros obtenidos así como sus respectivos valores predictivos tanto positivos como negativos. En referencia al papel que desempeñan estas pruebas en la detección de los individuos enfermos o con un factor de riesgo (por ej. individuos bebedores), la sensibilidad de una prueba de laboratorio se define como la probabilidad, en los enfermos, de tener la prueba positiva, mientras que la especificidad se define como la probabilidad, en los sanos, de obtener un resultado negativo en la prueba. El valor predictivo positivo (VPP) se define como la probabilidad de que los que tengan la prueba positiva, sean enfermos mientras que el valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad de que los que tengan la prueba negativa sean

Valoración de la prueba	Consumidor alcohol	No consumidor de alcohol	Fórmulas
Prueba positiva	a	b	Sensibilidad= $a/a+c$
Prueba negativa	c	d	Especificidad= $d/b+d$
La eficacia se valora en función de los resultados de las fórmulas			VPP= $a/a+b$ VPN= $d/c+d$

Tabla 3.6. Fórmulas para valorar la eficacia, mediante el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo

sanos (**Tabla 3.6**)

La eficacia se valora en función de los resultados de las fórmulas VPP= $a/a+b$

VPN= $d/c+d$

3.2.4 Virus de hepatitis B y C

3.2.4.1 VIRUS DE HEPATÍTIS B (VHB)

Virus DNA que presenta en suero proteínas virales y anticuerpos a que dan lugar los cuales se han determinado en los 120 pacientes de los grupos 1, 2 y 3 y en los 72 pacientes del grupo externo de validación o grupo 4. La determinación de antígenos y anticuerpos de VHB se ha llevado a cabo mediante el Sistema AXSYM de Abbot, mediante técnicas de Enzaimunoen ensayo de micropartículas (MEIA), que han permitido un aumento de la cinética del ensayo y un acortamiento de los tiempos de incubación necesarios. Se han determinado e interpretado los siguientes antígenos y anticuerpos:

-Antígeno de superficie (Ag HBs) : Este antígeno se produce y encuentra en el citoplasma del hepatocito y en la sangre durante el período de incubación, la fase aguda de la enfermedad y en el estadio crónico. Si persiste positivo más allá del sexto mes de la enfermedad, define la situación de hepatitis crónica.

-Anticuerpo anti-HBs (anti-HBs): Es el indicador de recuperación de la enfermedad, último marcador en aparecer, haciéndolo aproximadamente a los tres meses de evolución de la enfermedad. En los individuos vacunados es el único marcador que se

hace positivo.

-Antígeno de la capsida (Ag HBc): Es un polipéptido propio de la nucleocápside viral que se sintetiza en el núcleo de a célula hepática en donde podemos encontrarle de forma aislada. Una vez sintetizado se ensambla con el Ag HBs en el citoplasma celular. No es posible hallarlo de forma aislada en el suero del enfermo. En las hepatitis crónicas persistentes se ha encontrado este antígeno casi exclusivamente en el núcleo del hepatocito, las formas crónicas activas puede encontrarse también el el citoplasma de las células hepáticas.

-Anticuerpo anti-HBc (anti-HBc): Se trata del primer anticuerpo que aparece en la enfermedad, siendo ya detectable con los primeros síntomas. El hallazgo aislado puede significar infección pasada o curada dada la larga persistencia de los mismos en el suero.

-Antígeno e (Ag HBe): Es detectable en la mayoría de los enfermos que se encuentran en la fase aguda y en las formas crónicas de hepatitis crónica activa (HCA). Su valor clínico radica en su excelente correlación con la presencia de replicación viral y viremia.

-Anticuerpo anti-HBe (anti-HBe): Indica generalmente buena evolución y baja infectividad. En los casos de hepatitis crónica en los que coexiste con Ag HBs suele indicar escasa actividad replicativa, coincidiendo casi siempre con histología hepática normal o hepatitis crónica persistente.

La presencia de una infección persistente se definía por la detección continua en la sangre de Ag

HBs en sangre, siendo también positivo el Ag HBe en caso de HCA.

Todos estos marcadores se han determinado en el presente estudio, para descartar la presencia de VHB. Sin embargo el criterio definitivo para considerarlo o no como positivo ha sido la determinación de viremia de VHB en sangre.

La determinación e identificación en sangre del VHB se ha llevado a cabo en todos los pacientes a través del estudio genómico e mediante técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta determinación se ha llevado a cabo en todos los pacientes estudiados en el laboratorio de análisis clínico MEGALAB S.A, mediante determinación cuantitativa de viremia expresada en UI/ml .

3.2.4.2 VIRUS DE HEPATITIS C (VHC)

RNA virus, en cuyo diagnóstico no disponemos de pruebas para la detección de antígenos circulantes como ocurre como en el caso del VHB, debido a que el VHC circula en sangre en concentraciones tan ínfimas que su detección no es posible mediante técnicas convencionales. Para su diagnóstico se han empleado en el presente estudio dos tipos de pruebas:

-Técnicas de detección de anticuerpos de VHC: Se ha llevado a cabo mediante el Sistema AXSYM de Abbot, mediante técnicas de Enzaimunoensayo de micropartículas (MEIA). Esta prueba diagnóstica pone de manifiesto la presencia de anticuerpos frente a diferentes antígenos constitutivos del virus o frente a proteínas producidas en su replicación. Su positividad es excluyente pues indica si el paciente tuvo o tiene contacto con el virus, pero no significa infección actual o crónica por el VHC.

-Pruebas de detección del Genoma Viral mediante PCR: Se lleva a cabo en sangre, mediante técnicas de RT-PCR, para la detección del RNA del VHC en

el laboratorio MEGALAB S.A. Para la calibración se ha empleado el Estándar Internacional de la OMS para detección y cuantificación de RNA VHC (muestra del VHC 96/790 del NIBSC con 50.000 UI, de VCH RNA). El rango de medida: 500-5.000.000 UI de VHC RNA/ml de suero.

La determinación y cuantificación del genoma VHC es el criterio que se ha empleado en el presente estudio para considerar a un paciente como positivo o negativo para el VHC .

3.2.5 Histológicas

La biopsia hepática se había realizado en el HGUGM a todos los pacientes de los grupos 1,2 y 3. La biopsia hepática se ha llevado a cabo en el presente estudio mediante dos posibles métodos: 1º Cateterización transyugular de una de las venas suprahepáticas (biopsia transyugular), en todos los pacientes de los grupos 2 y 3 2º Punción directa del hígado a través de la piel (biopsia percutánea), en los pacientes del grupo 1. Se han obtenido en ambos casos un fragmento de tejido hepático. Las biopsias de los pacientes con hepatopatía o sospecha de la misma de origen etílico, o aquellos con cirrosis no etílica con alteraciones de la coagulación, se han llevado a cabo mediante biopsia transyugular, debido a que este método ha permitido en el presente estudio obviar las contraindicaciones debidas a alteración de las pruebas de la coagulación (como es conocido muy presentes en la mayoría de los pacientes con hepatopatía), puesto que su única contraindicación era la existencia de una colangitis, no presente en ninguno de los 120 pacientes biopsiados. La muestra de tejido hepático una vez en el Departamento de Anatomía Patológica del HGUGM se procesaba de la siguiente forma: Todos los especímenes se han fijado en en formol tamponado al 10% durante 18- 24 horas, luego la totalidad de la biopsia se incluye en parafina con

un procesador automático. Toma de los cortes histológicos con un microtomo de rotación. Por último tinciones histológicas e inmunohistoquímica. El método que se ha empleado en el laboratorio de A.Patológica de forma rutinaria es el de Harris, que comprende los siguientes pasos:

Los portas se colocan en cestillos de tinción que se introducen durante 8 o 15 minutos en la fórmula de tinción de Harris.

Se retira el exceso de hematoxilina con agua del grifo.

Posteriormente se diferencia utilizando una mezcla de ácido hidrociorhídrico al 1% y etanol 70% durante 5 o 10 segundos.

Se aclara con agua.

Se azulean los portas durante 30 o 90 segundos en una solución de amoniaco débil o en una solución de carbonato de litio.

Se lavan en agua 5 o 10 minutos.

Se introducen durante 15 segundos a tres minutos en la solución de eosina.

Se deshidratan en etanol al 95% (2x2 minutos) y de 100% (2x2 segundos).

Finalmente, se introducen en xileno y se montan.

En cuanto a las técnicas de estudio utilizadas han sido las siguientes:

-Tinción con hematoxilina-eosina.

- Tinción de Masson:

Es una técnica de tinción que se utiliza para teñir las fibras colágenas en el espacio extracelular, donde se observan las mismas de color azul .

Todas las biopsias fueron estudiadas mediante técnicas inmunohistoquímicas para la detección de antígenos y anticuerpos anti-VHB. Para la demostración de antígenos se ha utilizado dos anticuerpos monoclonales: Anticuerpo para la demostración de la proliferación celular, utilizándose el anticuerpo monoclonal Ki-67 (MIB-1) (Laboratorios Immunotech S.A, 130, av de Lattre de Tassigny

BP 177, 13276, Marseille Cedex 9-France); anticuerpo para el estudio del epitelio biliar o AE-1, anticuerpo de 053 D del grupo (Laboratorios Biomedica P.O box Foster City CA, 94404-8045 USA). El procedimiento inmunohistoquímico de tinción corresponde a las técnicas indirectas mediante el Complejo Avidina-Biotina marcado con peroxidasa, para la realización de las mismas se ha utilizado el sistema supersensitivo StrAvigen (Laboratorios Biogenex 4600 Norris Canyon Road, USA) y el Kit ABC (laboratorios Vector, Burlingame CA, USA), respectivamente.

La técnica mediante el complejo Avidina-biotina consta de los siguientes pasos:

Desparafinización e hidratación de los cortes.

Bloqueo de la peroxidasa endógena por medio de una solución de agua oxigenada en metanol al 5% durante cinco minutos.

Incubación de los cortes en buffer citrato 0,1 M en microondas en tres pasos de tres minutos cada uno.

Lavado en PBS durante cinco minutos.

Incubación con suero bloqueador durante diez minutos.

Incubación con el anticuerpo primario correspondiente durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Lavado en PBS durante cinco minutos.

Incubación con el anticuerpo secundario biotinado durante treinta minutos.

Lavado en PBS durante cinco minutos.

Incubación con el complejo Avidina-Peroxidasa-Biotina durante una hora.

Lavado en PBS durante cinco minutos.

Incubación con la solución reveladora de Diaminobencidina durante tres minutos.

Lavado en agua destilada.

Ligera tinción de contraste con hematoxilina de Karazzi.

Lavado breve en agua corriente, deshidratación, aclaramiento y montaje en medio permanente.

Se han revisado en el presente estudio los informes histológicos de las 120 biopsias hepáticas correspondientes a otros tantos pacientes, siendo fundamental el criterio histológico para la diferenciar los casos y controles, mediante la definición histológica de HAA: el patrón oro que ha definido la HAA en el presente estudio es la presencia de infiltrado de polimorfonucleares en la biopsia hepática. La no presencia del mismo era criterio de exclusión del grupo 3. La totalidad de las biopsias han sido estudiadas por dos observadores en al menos dos ocasiones distintas con una correlación diagnóstica superior al 90%.

3.2.6 Variables Genéticas.

Se han estudiado los polimorfismos genéticos de ADH, ALDH y CYP450 mediante extracción de DNA en todas las muestras de biopsias hepáticas, realizándose dicho proceso en el Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria, Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Análisis de polimorfismos

La identificación de las mutaciones genéticas en los genes implicados en el metabolismo del etanol, que se describen en la tabla 3.7, se realizó mediante un proceso de amplificación por PCR, del DNA previamente extraído de las muestras de biopsia hepática o de sangre y empleando parejas de cebadores específicos flanqueantes de la región donde se localiza la mutación:

3.2.6.1. Extracción de DNA

Se ha purificado DNA a partir de cada una de las muestras de biopsia y de sangre total mediante un método de extracción con fenol/cloroformo seguido de precipitación alcohólica.

El método de fenol/cloroformo permite separar el DNA del resto de componentes celulares, principal-

Nº biopsia	Conocida sólo por investigadores		
Edad	En años		
Sexo	Varón	Mujer	
Grupo según biopsia	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Consumo (CAGE+Historia clínica)	En UBES según clasificación del ministerio		
VHB	Positivo	Negativo	
VHC	Positivo	Negativo	
GOT	En UI/l	Valores referencia de HGUGM	
GPT	En UI/l	Valores referencia de HGUGM	
GGT	En UI/l	Valores referencia de HGUGM	
LEUCOCITOS	En mm3	Valores referencia de HGUGM	
BR	En mg/dl	Valores referencia de HGUGM	
ECOGRAFIA	Informe de Ecografía anterior a biopsia		
INFORME DE BIOPSIA	Informe del Departamento de A.Patológica del HGUGM		

Tabla 3.7. Relación de los genes estudiados con sus correspondientes polimorfismos genéticos y las mutaciones analizadas

mente proteínas restos de membranas, etc, en condiciones óptimas para su utilización como molde en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y permite variaciones en el protocolo que facilitan la extracción de un DNA de mayor calidad de muestras relativamente complicadas.

El procedimiento experimental que se ha empleado en la extracción de DNA a partir de biopsias hepáticas ha sido el siguiente:

Añadir 400 µl de tampón de lisis a los tubos donde se encuentran los cilindros de parafina con las muestras correspondientes.

Añadir 50 µl de SDS 10%.

Añadir 50 µl de solución de Proteinasa K (20 mg/ml). Incubar 6 horas a 37 °C.

Repetir dos veces los pasos 3 y 4, hasta que la muestra se haya disuelto totalmente en el tampón de lisis.

Añadir un volumen de Fenol: Cloroformo: Isoamílico (25:24:1).

Agitar suavemente por inversión del tubo e incubar en hielo durante 10-15 minutos, agitando cada 5 minutos.

Centrifugar durante 15 minutos a 6000 rpm.

Extraer cuidadosamente la fase acuosa superior que contiene el DNA y depositarla en otro tubo.

Añadir 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 6.8 y un volumen de isopropanol frío.

Agitar y mantener a -20 °C durante 45-60 minutos.

Centrifugar durante 30 minutos a 10000 rpm.

Retirar el sobrenadante por vuelco del tubo y lavar con 50 µl de etanol 80% frío.

Dar un pulso de centrifuga y retirar el etanol cuidadosamente con la punta de pipeta.

Secar al vacío en el speed-vac hasta que no quede ningún rastro de etanol.

Resuspender el precipitado en 50 µl de agua destilada estéril permitiendo a continuación la resuspensión del DNA.

Posteriormente y para comprobar la cantidad y calidad del DNA extraído es necesario migrarlo en un gel de agarosa al 1 % y comparar las bandas con los marcadores de peso molecular (ver apartado **Electroforesis DNA en geles de Agarosa**).

3.2.6.2. AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):

El PCR permite la amplificación específica de una secuencia determinada de DNA varios millones de veces en un tiempo de pocas horas (**FIGURA 3.1**), independientemente de su origen (virus, bacterias, plantas, animales o humanos).

Constituye la etapa central del análisis de biomarcadores de tipo genético, ya que es en esta fase

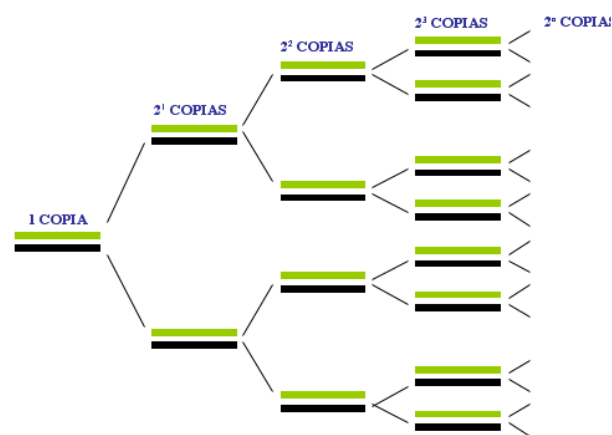


Fig 3.1. Esquema global del proceso de Amplificación de DNA por PCR, mostrando como el número de copias aumenta de forma exponencial en cada ciclo realizado. El número final de copias puede llegar a varios millones en función del número inicial de copias y del número de ciclos (2^n).

donde se realiza un análisis dirigido al estudio de los genes de interés, en este caso relacionados con el metabolismo del etanol.

Esencialmente, la técnica se basa en el uso de oligonucleótidos específicos que permiten la amplificación específica de las secuencias de DNA en las que puede estar presente la mutación. Esta técnica se lleva a cabo mediante la incubación en tubos de ensayo del DNA, previamente purificado, de cada individuo que va a actuar como molde junto con los oligonucleótidos correspondientes a cada región específica y una enzima *Taq* DNA polimerasa que va a catalizar la formación de nuevas he-



Fig 3.2.
Termociclador
Eppendorf.
Mastercycler
gradient.

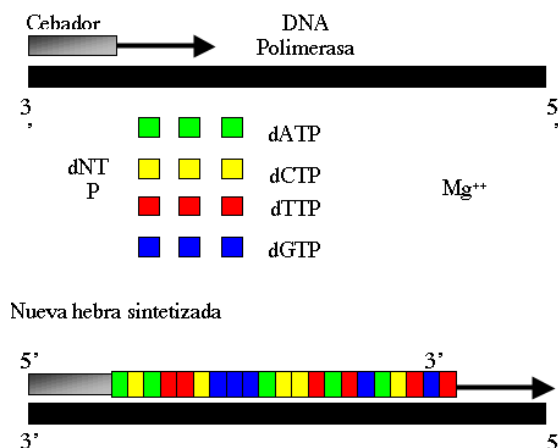


FIGURA 3.3. Necesidades de la reacción de PCR. Los requerimientos son dNTP, *Taq* DNA polimerasa, una pareja de cebadores, un ácido nucleico molde y un tampón adecuado con magnesio.

bras de DNA idénticas a la original. Todo esto se lleva a cabo en un equipo denominado termociclador (**FIGURA 3.2**), el cual mediante cambios secuenciales de temperatura desarrolla cada una de las etapas de las que consta la reacción de PCR.

Los requerimientos de la reacción son (**FIGURA 3.3**):

DNA bicatenario molde.

Dos oligonucleótidos (cebadores) que flanquean el segmento a amplificar.

DNA polimerasa termoestable.

$MgCl_2$.

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs).

Tampón con sales.

Tanto los dNTP como los cebadores se añaden en

exceso de forma que la síntesis puede repetirse cíclicamente calentando las nuevas hebras de DNA sintetizadas, separándolas y enfriando para permitir la hibridación de los cebadores en sus regiones complementarias.

De una manera mas ampliada las etapas que constituyen el proceso son las siguientes:

3.2.6.2.1 Desnaturalización del DNA

Un primer paso necesario en la técnica de PCR para la amplificación del DNA es la separación de las dos hebras que forman la doble hélice originando DNA monocatenario para poder llevar a cabo la síntesis de nuevas moléculas de DNA. Una de las principales propiedades de la doble hélice de DNA es la capacidad de separación de las dos cadenas sin necesidad de romper uniones covalentes. Esto hace posible que, *in vitro*, las cadenas puedan disociarse y reasociarse por calentamiento y enfriamiento.

La desnaturalización del DNA molde constituye la primera etapa del ciclo de PCR y se realiza calentando el DNA a $95^{\circ}C$ durante un tiempo comprendido entre 30 s y 1 min. Normalmente, antes del inicio del primer ciclo de PCR se introduce un periodo extra de desnaturalización de 2-5 minutos a $95^{\circ}C$ (**FIGURAS 3.4 y 3.5**) para eliminar posibles estructuras secundarias entre distintas partes de la molécula, conduciendo, de esta forma, a la desnaturalización total del DNA

3.2.6.2.2 Hibridación de los cebadores

Una vez producida la separación de las dos hebras del DNA molde es necesario bajar la temperatura del proceso para permitir la hibridación de los cebadores con las hebras en estado monocatenario del DNA molde en aquellas regiones donde se de complementariedad de bases. Esta temperatura a la que se produce el apareamiento de los

cebadores no es fija, dependiendo fundamentalmente de la composición en bases y de la longitud del cebador, pero de una manera genérica las temperaturas en las que se llevan a cabo esta etapa están en torno a los 55-60 °C (**FIGURAS 3.4 y 3.5**). Durante este proceso de hibridación en que se parte de DNA en forma de hebra sencilla, el encuentro de las cadenas se produce al azar de manera que la eficacia de la hibridación de los cebadores con el DNA molde no es total en cada ciclo, puesto que la hibridación se puede volver a producir entre las moléculas de DNA molde.

3.2.6.2.3 Extensión de los cebadores

Durante esta fase, se va a producir la incorporación de los dNTP complementarios a la hebra molde por

medio de la enzima DNA polimerasa. La extensión se produce por el extremo -OH en posición 3', el cual va a reconocer la DNA polimerasa utilizándolo como base para la incorporación del desoxinucleótido correspondiente de forma que la extensión de la nueva cadena se produce en sentido 5'Æ3'. La elección de cada uno de los dNTP que se añaden a la cadena en crecimiento viene regida por el apareamiento de bases con la cadena complementaria. Este paso del ciclo se realiza normalmente a 72 °C, temperatura óptima de catálisis de la enzima (**FIGURAS 3.4 y 3.5**).

3.2.6.2.3 Protocolo de PCR utilizado en el presente estudio

Una vez realizadas las extracciones de DNA de

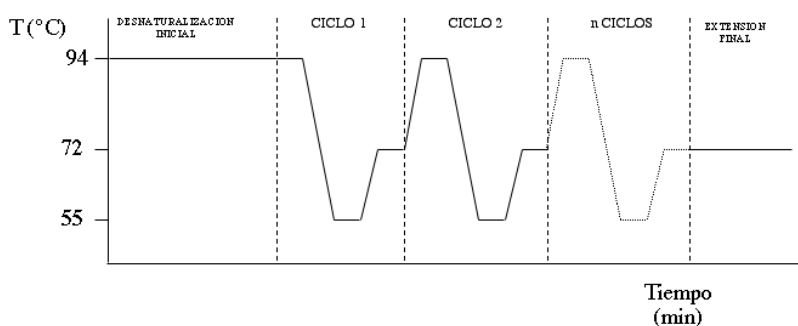
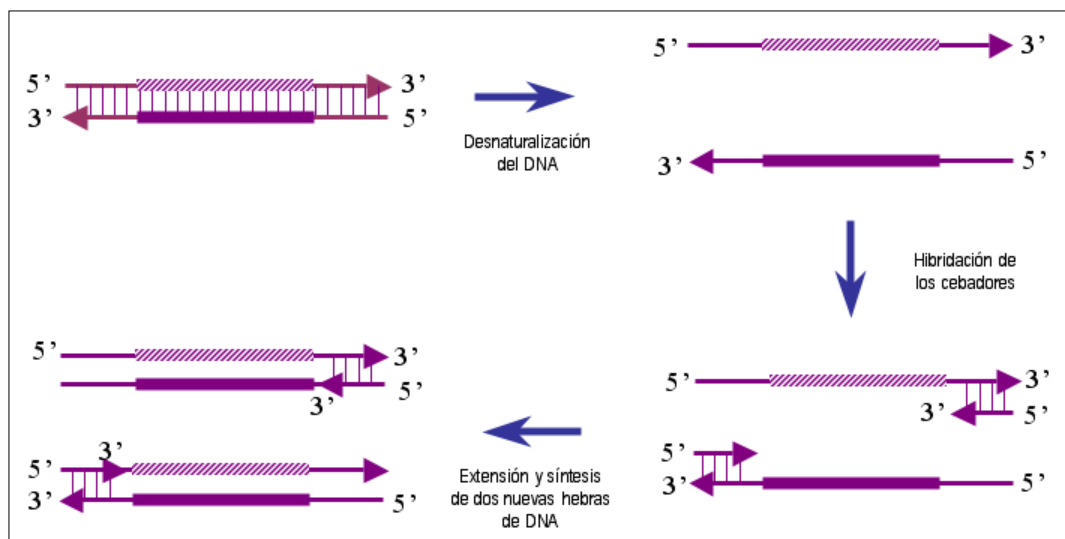


FIGURA 3.4. Esquema de un perfil de cambios de temperatura en una reacción de PCR mostrando los distintos pasos en cada ciclo que se repite, la desnaturalización inicial del DNA calentando a 95 °C y el periodo de extensión extra a 72 °C. En este ejemplo, el DNA se desnaturaliza a 95 °C, se baja la temperatura a 55 °C permitiendo la hibridación específica de los cebadores a sus secuencias complementarias y finalmente se eleva la temperatura a 72 °C para que se produzca la elongación por la *Taq* polimerasa.

FIGURA 3.5. Esquema de las diferentes etapas que tienen lugar en un ciclo de PCR mostrando la desnaturalización del DNA, la hibridación específica de los cebadores y la extensión por parte de la *Taq* polimerasa.



Polimorfismo	Locus	Localización	Mutación	Tamaño amplificado
ADH2*2	4q22	Exón 3	R47H (G→A)	98 pb
ADH2*3	4q22	Exón 9	R369C (C→T)	100pb
ALDH2*2	12q24.2	Exón 12	E487K (G→A)	100 pb
CYP2E1 (<i>Rsa</i> I)	10q24.3-qter	Región 5'	Sitio Rsa (C→T)	107 pb
CYP2E1 (<i>Pst</i> I)	10q24.3-qter	Región 5'	Sitio Pst (G→C)	103 pb

Tabla 3.8. Relación de tamaños de los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a cada uno de los polimorfismos genéticos.

cada biopsia de los 120 pacientes y de sangre de los 72 sujetos incluidos en el Grupo 4, se amplificaron mediante PCR cada una de las zonas a estudiar empleando cebadores específicos diseñados de forma individualizada a partir de las secuencias de genes disponibles en el Gene Bank. En total, para cada una de las muestras se realizaron 5 amplificaciones de PCR, correspondientes a los 5 polimorfismos estudiados, citados anteriormente, obteniéndose en cada caso fragmentos de alrededor de 100 pares de bases.

A continuación se indican las regiones específicas que se han amplificado por PCR, la localización de los cebadores dentro de esa secuencia y el procedimiento experimental seguido para cada uno de los polimorfismos estudiados. El tamaño de los fragmentos de DNA de las zonas amplificadas después de la PCR se muestra en la Tabla 3.8.

De una manera más pormenorizada se muestran a continuación las secuencias de los cebadores empleados, las secuencias de DNA amplificadas, la localización interna de las mutaciones estudiadas, así como las condiciones de amplificación para cada uno de los polimorfismos analizados:

Alcohol Deshidrogenasa 2: Polimorfismo ADH2*2

Localización: GEN: **4q22**
REGIÓN: **EXÓN 3**

Mutación: Transición **G → A** (R47H)

Cebadores:

ADH2*2-F: 5' **TGTAGATGGTGGCTGTAGGA** 3' (20 b; T_m= 60 °C)
ADH2*2-R: 5' **GGCTGCCTCATGGCCTAAA** 3' (19 b; T_m= 60 °C)

Secuencia amplificada (98 pb)

5' **TGTAGATGGTGGCTGTAGGA**ATCTGTC**G**CACAGATGACCACGT
GTTAGTGGCAACCTGGTGACCCCTTCCTGTGAT**TTTAGGCC**
ATGAGGCAGCC 3'

Procedimiento Experimental

DNA molde	2 µl
Cebador ALDH2*2-F 10µM	1 µl
Cebador ALDH2*2-R 10µM	1 µl
Tampón 10X	2.5 µl
MgCl ₂ 50 mM	0.75 µl
dNTPs 10mM	0.25 µl
H ₂ O estéril	16.5 µl
<i>Taq</i> polimerasa 1 UI/µl	1 µl

95°C	5 min
95°C	1 min
57°C	45 sg
72°C	30 sg
72°C	10 min

40 ciclos

Alcohol Deshidrogenasa 2: Polimorfismo ADH2*3

Localización: GEN: 4q22

REGIÓN: EXÓN 9

Mutación: Transición C → T (R369C)

Cebadores:

ADH2*3-F: 5'-TGTCCTCTCTTCCTATTGC 3' (20 b; Tm= 56 °C)
ADH2*3-R: 5'-TGTAGGGTAGAGGAGGCTGA 3' (20 b; Tm= 62 °C)

Secuencia amplificada (100 pb)

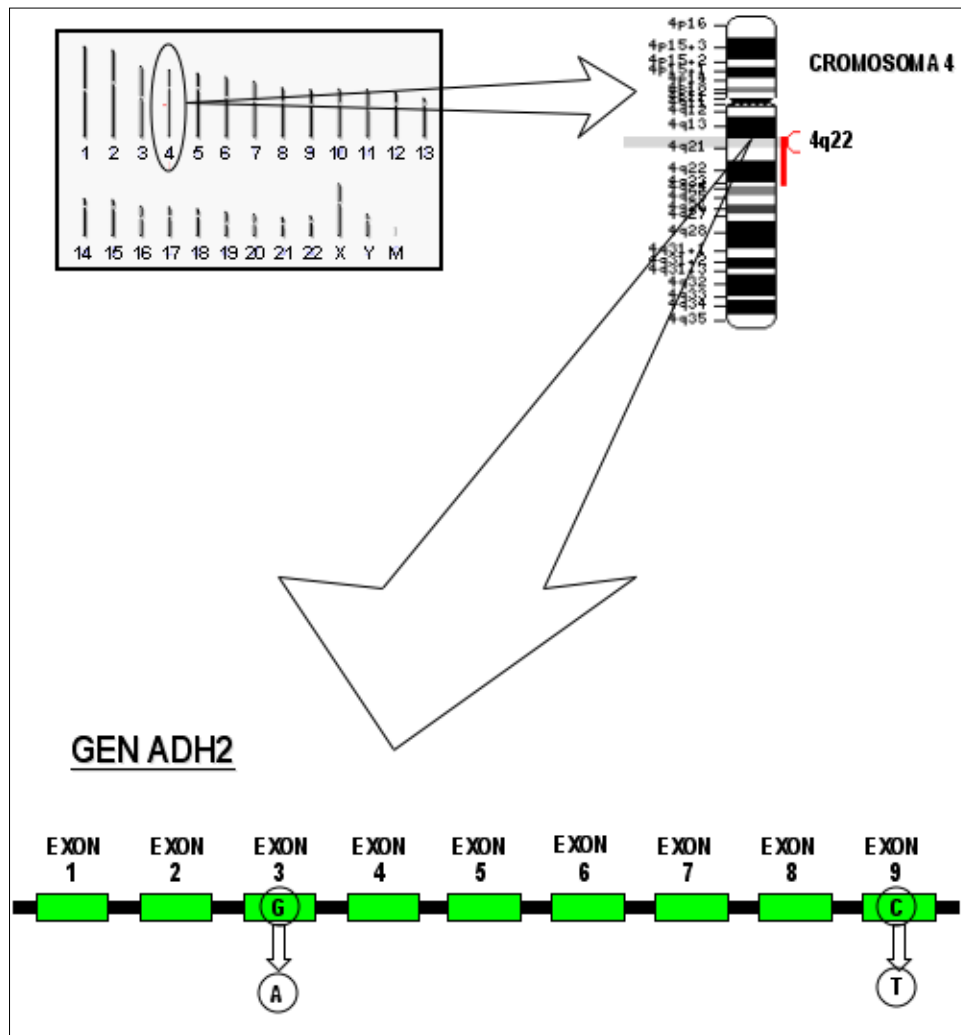
5'-TGTCCTCTCTTCCTATTGCAGTATC GTACCGTCCTGACGTTT
TGAGGCAATAGAGATGCCTTCCCTGTAGCAGTCTTCAGCCTCCT
CTACCTACA 3'

Procedimiento Experimental

DNA molde	2 µl
Cebador ALDH2*2-F 10µM	1 µl
Cebador ALDH2*2-R 10µM	1 µl
Tampón 10X	2.5 µl
MgCl ₂ 50 mM	0.75 µl
dNTPs 10mM	0.25 µl
H ₂ O estéril	16.5 µl
Taq polimerasa 1UI/µl	1 µl

95° C	5 min
95° C	1 min
52° C	45 sg
72° C	30 sg
72° C	10 min

40 ciclos



Citocromo P450 2E1: Región *Rsa* ILocalización: GEN: 10q24.3-qter

REGIÓN: ZONA 5' FLANQUEANTE DEL GEN

Mutación: Transición C → T (C-1019T)Cebadores:


RSA-F: 5' **TATTTCTTCATTTCATC** 3' (20 b; Tm= 50 °C)
 RSA-R: 5' **CTGGCAATATATAGAAGTC** 3' (20 b; Tm= 54 °C)

Secuencia amplificada (107 pb)

RSA-F: 5' **TATTTCTTCATTTCATC** 3' (20 b; Tm= 50 °C)
 RSA-R: 5' **CTGGCAATATATAGAAGTC** 3' (20 b; Tm= 54 °C)

Procedimiento Experimental

DNA molde	2 µl
Cebador RSA-F 10 µM	1 µl
Cebador RSA-R 10 µM	1 µl
Tampón 10X	2.5 µl
MgCl ₂ 50 mM	0.75 µl
dNTPs 10mM	0.25 µl
H ₂ O estéril	16.5 µl
Taq polimerasa 1UI/µl	1 µl

95°C	5 min	
95°C	1 min	
50°C	45 sg	
72°C	30 sg	
72°C	10 min	

Citocromo P450 2E1: Región *Pst* ILocalización: GEN: 10q24.3-qter

REGIÓN: ZONA 5' FLANQUEANTE DEL GEN

Mutación: Transición G → C (G-1259C)Cebadores:


PST-F: 5' **GAAGCAAAGGCCCTGAA** 3' (18 b; Tm= 56 °C)
 PST-R: 5' **GCCACATAAGCAAGTCATTG** 3' (20 b; Tm= 58 °C)

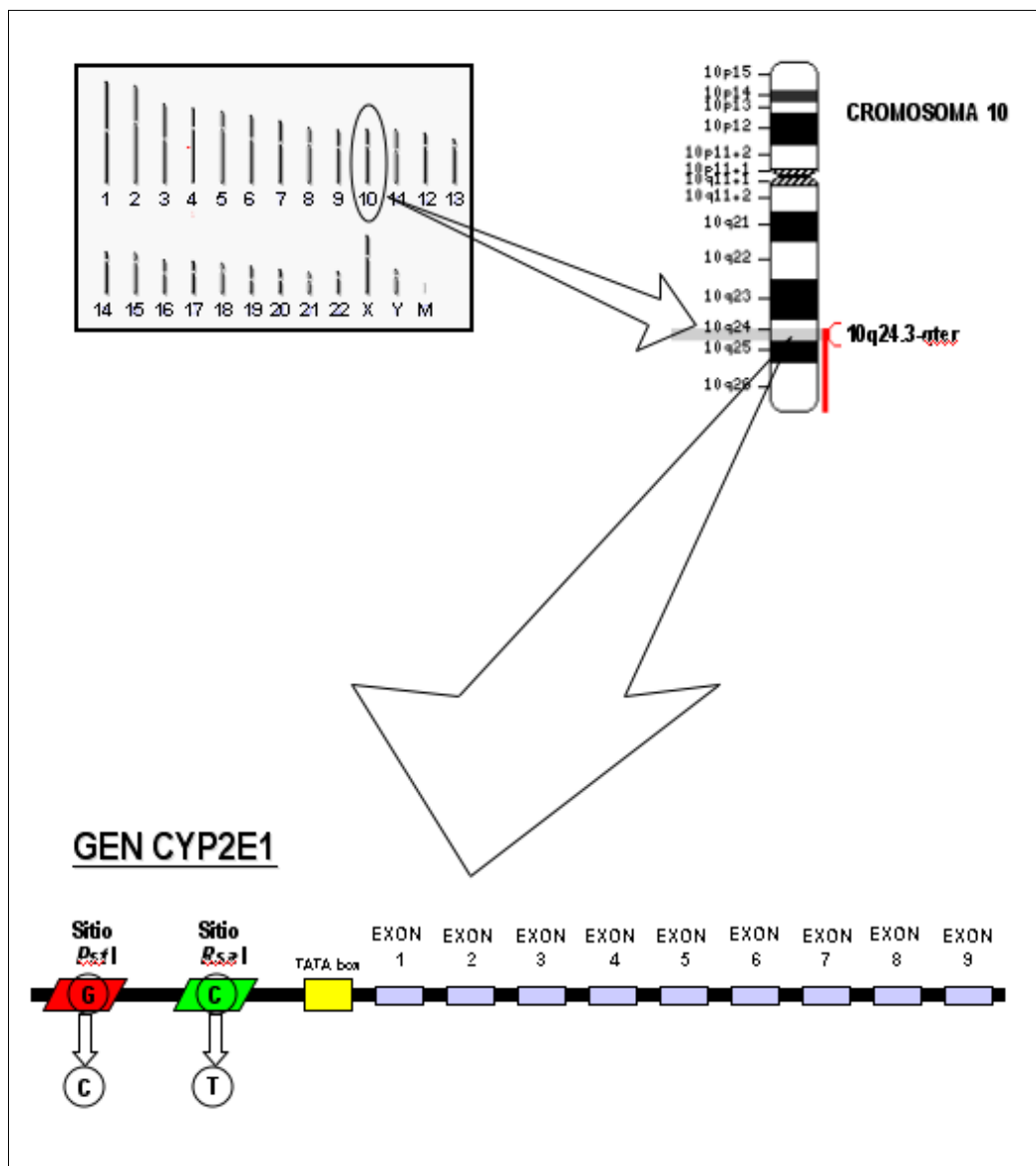
Secuencia amplificada (103 pb)

5' **GAAGCAAAGGCCCTGAA** GCCTCTGCCAGAGGCCAACGCCCTTCTT
 GGTTCAAGGAGAG **GTGCAGTGTAGGTGCAGCACAAACCAATGACTTGCTT**
ATGTGGC 3'

Procedimiento Experimental

DNA molde	2 µl
Cebador PST-F 10 µM	1 µl
Cebador PST-R 10 µM	1 µl
Tampón 10X	2.5 µl
MgCl ₂ 50 mM	0.75 µl
dNTPs 10mM	0.25 µl
H ₂ O estéril	16.5 µl
Taq polimerasa 1UI/µl	1 µl

95°C	5 min	
95°C	1 min	
50°C	45 sg	
72°C	30 sg	
72°C	10 min	



Una vez obtenidos los productos de amplificación y comprobada su especificidad mediante visualización a través de un proceso de electroforesis sobre geles de agarosa al 2,5 % teñidos con bromuro de etidio, se procedió a efectuar el proceso de identificación de mutaciones.

3.2.6.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis es un sistema de transporte de moléculas bajo la acción de un campo eléctrico. Cuando se aplica un campo eléctrico a un gel de

agarosa, los fragmentos de DNA, cargados negativamente a pH neutro, debido a sus grupos fosfato, migran hacia el polo + (ánodo) con una velocidad de migración inversamente proporcional a su tamaño. De esta forma los fragmentos de DNA contenidos en una muestra se irán separando en su recorrido en función de la masa molecular que posean. La matriz más utilizada para la electroforesis de DNA es la agarosa, polisacárido extraído de las algas marinas y compuesto por β -D-galactopiranosas y 3,6-anhidro- α -L-galactopiranosas. Normalmente, funden a temperaturas cercanas a los 90 °C y

gelifican en torno a los 35 °C. Al gelificar, la agarosa genera una matriz dejando entre sí espacios donde se aloja el líquido y por los que van a migrar las moléculas cargadas. En función de la concentración de agarosa empleada, la densidad de esta matriz será más o menos compacta y por lo tanto el tamaño del poro por el que migrarán las moléculas será más grande o más pequeño.

La electroforesis en geles de agarosa se realiza en un plano horizontal con éstos sumergidos en un tampón. Debido a esto, las muestras de DNA han de tener una elevada densidad para que permanezcan en el interior del pocillo durante el proceso de carga. Por ello, las muestras se mezclan con un tampón de carga, que contiene glicerol (incrementa la densidad) y uno o dos colorantes cargados negativamente (azul de bromofenol y/o xilen cya-nol) que con su migración actúan de indicadores del avance de las muestras.

Para estimar el tamaño y la concentración de los fragmentos de DNA analizados, se incluye en el gel, de forma simultánea, un conjunto de marcadores de tamaño y concentración conocidos.

La visualización del DNA en los geles se hace mediante tinción con el colorante fluorescente bromuro de etidio, que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA. La detección de los fragmentos de DNA se realiza en un transiluminador ultravioleta (UV).

3.2.6.4.1 Procedimiento experimental

A continuación se detalla el protocolo experimental empleado en la realización de las electroforesis de DNA:

Preparación de un gel de agarosa al 1% o al

2.5%

Disolver 1 gr ó 2.5 gr de agarosa a un matraz erlenmeyer conteniendo 100 ml de tampón TAE calentando en horno microondas.

Enfriar la agarosa y preparar el molde o soporte donde se va a preparar el gel, sellándolo bien alrededor con cinta adhesiva.

Una vez sellado, situar el soporte en una superficie horizontal y colocar el peine de forma perpendicular a la dirección de migración del gel y evitando que la base de los dientes toquen la superficie del soporte. El peine se utiliza como molde que delimitará los pocillos donde se cargarán las muestras en el gel.

Añadir bromuro de etidio a la agarosa fundida a un concentración de 0.2 µg/ml.

Verter cuidadosamente la agarosa evitando la formación de burbujas y dejar solidificar.

Una vez que la agarosa está gelificada, retirar cuidadosamente el peine y la cinta adhesiva que está alrededor de la base del soporte.

Colocar el soporte con el gel sobre la cubeta de electroforesis y cubrirlo con tampón TAE.

3.2.6.4.2. Aplicación de las muestras y electroforesis

Antes de aplicar las muestras en los pocillos del gel, es preciso añadirles 1/6 de su volumen de tampón de carga 6X.

Dar un pulso de centrifuga para depositar la muestra en el fondo del tubo.

Cargar en el primer pocillo del gel el marcador de DNA a utilizar en cada caso.

En los siguientes pocillos cargar el DNA previamente mezclado con el tampón de carga de la misma forma que se hizo con los marcadores.

Conectar los cables desde la fuente de alimentación a cada extremo de la cubeta (el DNA debe migrar hacia el polo positivo, electrodo rojo). Fijar el voltaje en torno a 70-80 V y dejar migrar el gel el

tiempo necesario para la separación de los fragmentos.

Cuando ha terminado el proceso, se visualiza el gel en un transiluminador de luz UV, a fin de que las bandas se hagan visibles permitiendo analizar los resultados.

3.2.6.5. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES GENÉTICAS

Debido a la naturaleza de la muestra de partida, el proceso de purificación de DNA fue un factor limitante en el desarrollo del proceso, obteniéndose la mayor parte del DNA extraído en un estado de alta degradación, lo que restringió enormemente el proceso de amplificación por PCR, impidiendo la obtención de productos amplificados de más de 100 pares de bases. En virtud de esta circunstancia y habida cuenta de la dificultad que entrañaba el manejar fragmentos de DNA de tan pequeño tamaño a la hora de aplicar técnicas de identificación de mutaciones genéticas como la digestión con enzimas de restricción (RFLP) se eligió la técnica de Single Base Extensión (SBE) para realizar el proceso de genotipado.

3.2.6.5.1. Single Base Extension (SBE)

La identificación de mutaciones genéticas mediante la técnica de SBE está basada en la utilización de oligonucleótidos específicos, que añadidos a un producto de PCR previamente amplificado permite identificar el tipo de nucleótido que ocupa una determinada posición.

La particularidad de esta técnica consiste en la naturaleza y composición del oligonucleótido de SBE, cuya última base en el extremo 3' terminal es la complementaria a la anterior que es susceptible de estar mutada.

El desarrollo de la técnica de SBE se llevó a cabo



Figura 3.6: Secuenciador automático de DNA ABI Prism 310 Genetic Analyzer (derecha) y detalle de la unidad analítica (izquierda). Este equipo es empleado en la determinación de mutaciones genéticas mediante la técnica de SBE.

en un secuenciador automático de DNA, *ABI 310 Genetic Analyzer* (Figura 3.6) mediante la utilización del kit comercial *ABI PRISM[®] SnaP Shot[™] Multiplex* kit de la casa comercial Applied Biosystems. Dicho kit contiene didesoxinucleótidos marcados con fluoróforos diferentes que impiden la adición de más nucleótidos, de forma que al realizarse una segunda reacción de amplificación de PCR, la *Taq* DNA polimerasa en la fase de extensión añadirá únicamente el nucleótido correspondiente, que a su vez se corresponderá con la posición a investigar.

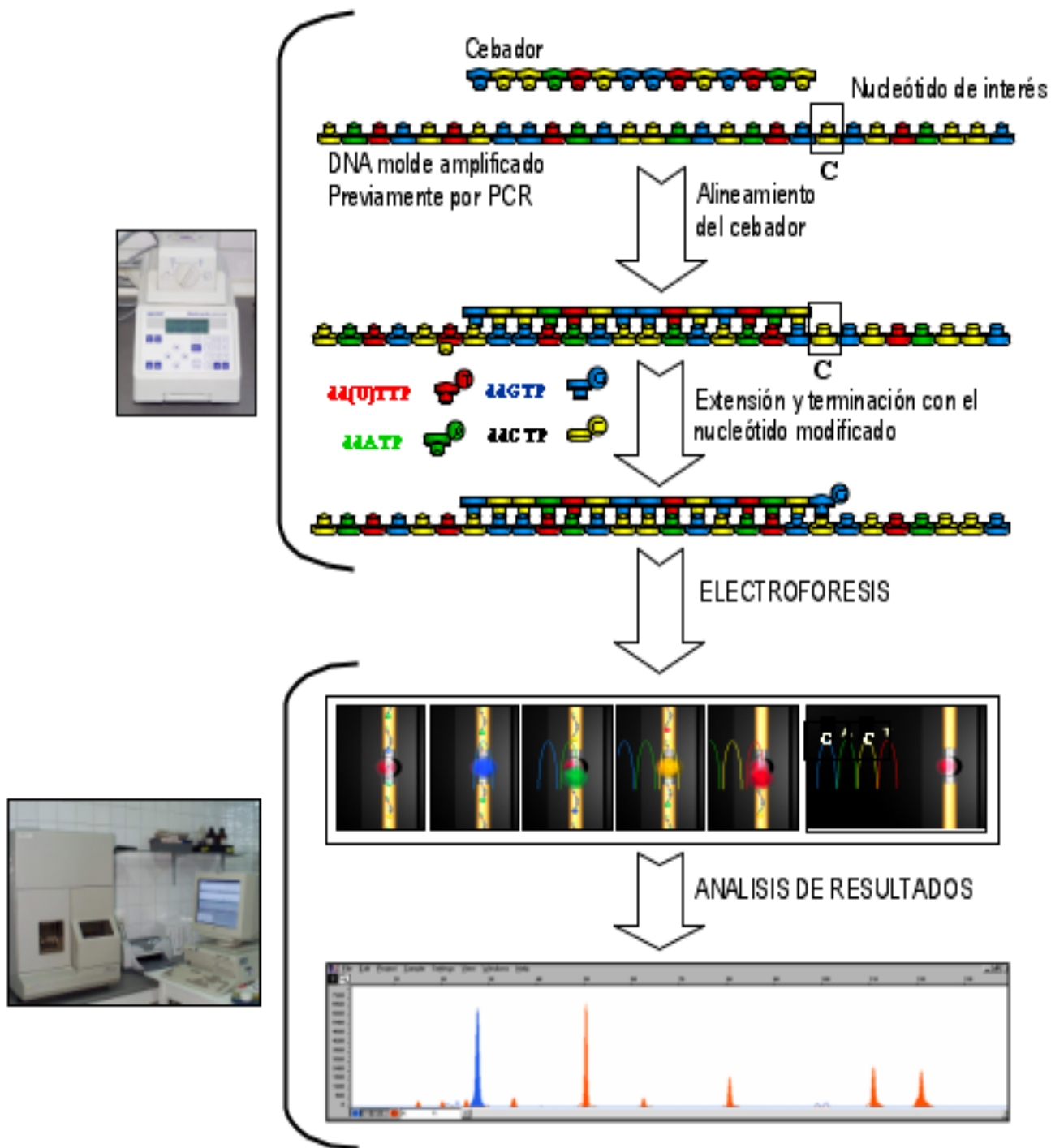


FIGURA 3.7: Esquema de la identificación de mutaciones genéticas mediante la técnica de SBE.

De esta forma se generarán nuevos fragmentos de PCR de la longitud inicial del oligonucleótido más un nucleótido adicional que ha incorporado la enzima *Taq* DNA polimerasa con la peculiaridad de que en esta circunstancia el tamaño del fragmento a estudiar es conocido de antemano. Adicionalmente su último nucleótido aparece marcado con fluorescencia, de forma que al ser sometido a electroforesis en el secuenciador automático se va a poder identificar la posición y la naturaleza del nucleótido de interés.

En la **Figura 3.7** se muestra un esquema resumido de la técnica empleada para la detección de mutaciones asociadas a genes implicados en el metabolismo de alcohol.

Teniendo en cuenta la metodología de la técnica, se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los polimorfismos de interés, los cuales se indican a continuación:

Alcohol Deshidrogenasa 2: Polimorfismo ADH2*2

ADH2*2-SNP: 5' GTCACCAGGTTGCCACTAACCACGTGGTCATCTGTG 3'

Tm: 112°C

Longitud: 36 bases

Alcohol Deshidrogenasa 2: Polimorfismo ADH2*3

ADH2*3-SNP: 5' ATT GCCTCAAAACGT CAGGACGGTAC 3'

Tm: 78°C

Longitud: 26 bases

Aldehído Deshidrogenasa mitocondrial: Polimorfismo ALDH2*2

ALDH2*2-SNP: 5' ACGGGCTGCAGGCATACACT 3'

Tm: 64°C

Longitud: 20 bases

Citocromo P450 2E1: Alelo c1 (Región *Rsa* I)

RSA-SNP: 5' ATACATAAAGATTCATTGTTAATATAAAAGTA 3'

Tm: 74°C

Longitud: 32 bases

Citocromo P450 2E1: Alelo c2 (Región *Pst* I)

PST-SNP: 5' CAACGCCCTTCTTGGTTCAGGAGAG 3'

Tm: 82°C

Longitud: 26 bases

Para optimizar la detección de las mutaciones se dividieron los cinco polimorfismos en dos grupos. Por un lado se analizaron las mutaciones correspondientes a ADH2*2 y ADH2*3, y por otro las mutaciones asociadas a ALDH2*2, CYP2E1 (*Rsa* I) y CYP2E1 (*Pst* I).

A continuación se detalla el protocolo experimental empleado en la detección de mutaciones asociadas a metabolismo de alcohol por SNP's.

Partiendo de los productos de PCR obtenidos según el protocolo indicado anteriormente se procedió a la eliminación de exceso de oligonucleótidos y dNTPs mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba (SAP) y Exonucleasa I (Exo I).

3.2.6.5.2. Protocolo por muestra

Añadir en un tubo: 15 µl de **POOL PRODUCTO de PCR*** + 5 µl de **SAP** 1U/ml (ROCHE)+ 0,1 ml de **Exo I** 20.000U/ml (New England Biolabs).

Mezclar bien: **VORTEX**. A continuación: **SPIN**

Incubar durante 1 hora a 37 ° C.

Incubar durante 15 minutos a 75 ° C (inactivación de la enzima).

Mantener a 4°C (periodo de tiempo corto) o a -20°C (periodo de tiempo largo).

Para ADH2*2 + ADH2*3:	7,5 µl	ADH2*2
	7,5 µl	ADH2*3
Para ALDH2*2 + CYP2E1(Rsa I)		
+ CYP2E1(Pst I):	5 µl	ALDH2*2
	5 µl	CYP2E1(Rsa I)
	5 µl	CYP2E1(Pst I)

***POOL PRODUCTO de PCR: Volumen total 15 ml**

Preparación de las muestras para la reacción de PCR empleando el oligonucleótido específico de cada SNP, mediante la utilización del kit comercial ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kit de la empresa Applied Biosystems:

Se utilizó un POOL de PRODUCTOS de PCR, y por tanto un POOL de los primer-SNP's correspondientes de cada grupo definido anteriormente. Se mantuvieron todos los tubos (tubos de muestra y tubos de reacción) en hielo.

Se prepararon las mezclas de reacción que se indican a continuación entre las que había un CONTROL POSITIVO, un CONTROL NEGATIVO y un tubo por MUESTRA:

CONTROLES			MUESTRA	
MEZCLA	VOL C. POSITIVO	VOL C. NEGATIVO	MEZCLA	VOL
MIX	5µl	5µl	MIX	5µl
MOLDE	2µl	Yµl	POOL Productos PCR *	3µl
PRIMER	1µl	1µl	POOL PRIMER-SNP	1µl
H ₂ O estéril	2µl	4µl	H ₂ O estéril	1µl
TOTAL	10µl	10µl	TOTAL	10µl

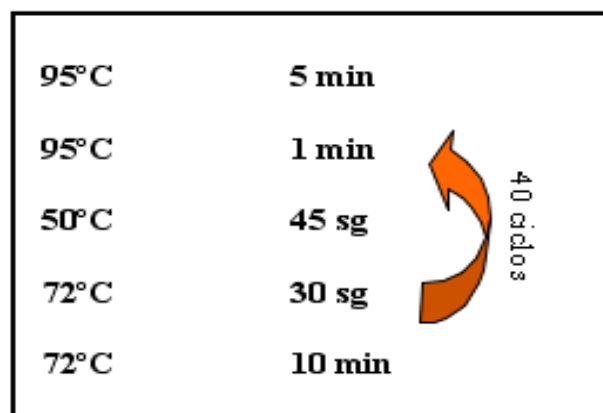
Mezclar bien: VORTEX. A continuación: SPIN

*** POOL PRODUCTO de PCR: Volumen total 3 ml**

Segunda reacción de PCR con el oligonucleótido

Para ADH2*2 + ADH2*3:	1,5 µl	ADH2*2
	1,5 µl	ADH2*3
Para ALDH2*2 + CYP2E1(Rsa I)		
CYP2E1(Pst I):	1 µl	ALDH2*2
	1 µl	CYP2E1(Rsa I)
	1 µl	CYP2E1(Pst I)

específico para cada mutación. Programa general para los cinco polimorfismos en el termociclador que se detalla a continuación:



Tratamiento post-extensión, con el fin de eliminar el exceso de [F]ddNTPs.

Protocolo por muestra y controles

Añadir 1 ml de SAP 1U/ml (ROCHE)

Incubar durante 1 hora a 37 ° C

Incubar durante 15 minutos a 75 ° C (inactivación de la enzima)

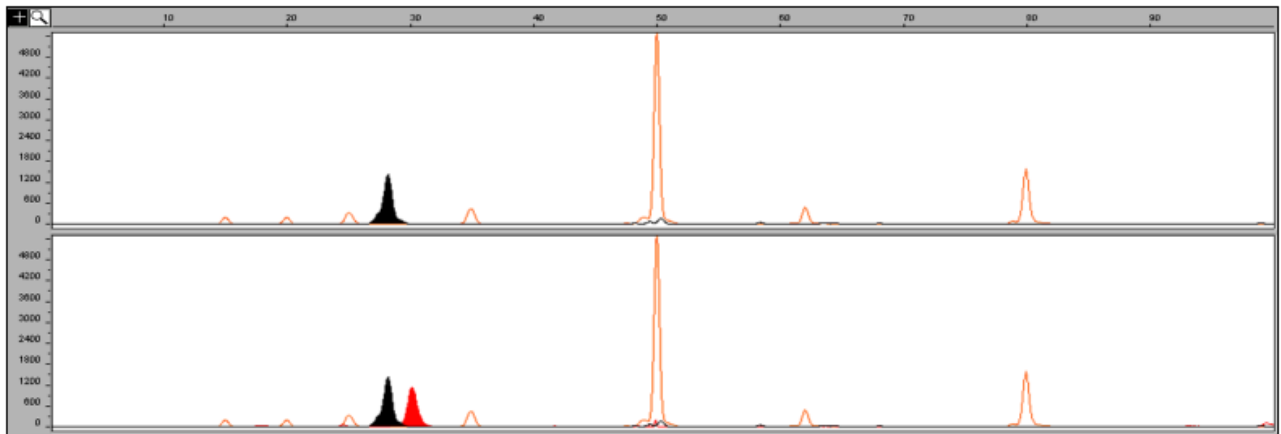
Mantener a 4°C (periodo de tiempo corto) o a -20°C (periodo de tiempo largo)

Aplicación y electroforesis de las muestras en el secuenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer para proceder a la identificación de las correspondientes mutaciones.

Gen estudiado	Polimorfismo	Mutación Analizada	Cambio de color
ADH2	ADH2*2	R47H (G→A)	Negro → Rojo
	ADH2*3	R369C (C→T)	Azul → Verde
ALDH2	ALDH2*2	E487K (G→A)	Azul → Verde
Citocromo P450 2E1	CYP2E1 (c1)	Región Pst (G→C)	Azul → Negro
	CYP2E1 (c2)	Región Rsa (C→T)	Negro → Rojo

Tabla XX. Colores observados en los diferentes electroferogramas en función de nucleótido que se incorpora durante el proceso de SBE. (Código de colores: Citosina[Negro; Guanina[Azul; Timina[Rojo; Adenina[Verde]).

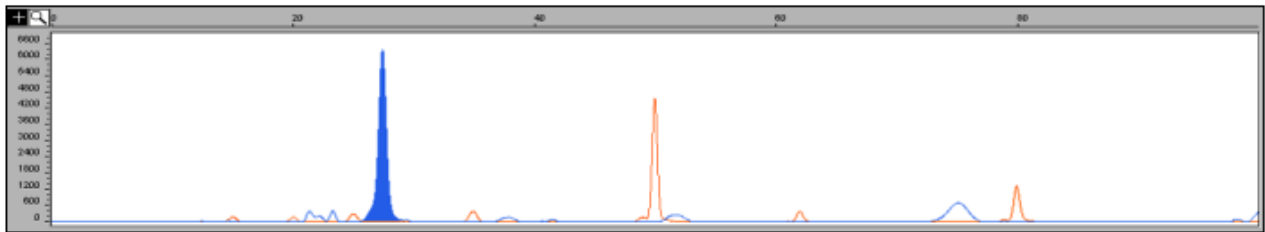
3.2.6.5.3.1. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE ALCOHOL DESHIDROGENASA



Análisis de alcohol deshidrogenasa (ADH2*2)
 Caracterización de la mutación R47H del gen del alcohol deshidrogenasa. Los picos que aparecen resaltados representan la posición de migración del fragmento de DNA amplificado mediante PCR donde se localiza la mutación.

La observación de un único **pico de color NEGRO**

indica la presencia de una GUANINA en la posición correspondiente del gen, lo cual revela la presencia de un residuo de ARGININA en posición 47 de la proteína, coincidente con el tipo HOMOCIGOTO NORMAL de alcohol deshidrogenasa.
 La observación de un **pico de color NEGRO** y otro de **color ROJO** coincide con el tipo HETEROCI-GOTO de alcohol deshidrogenasa.

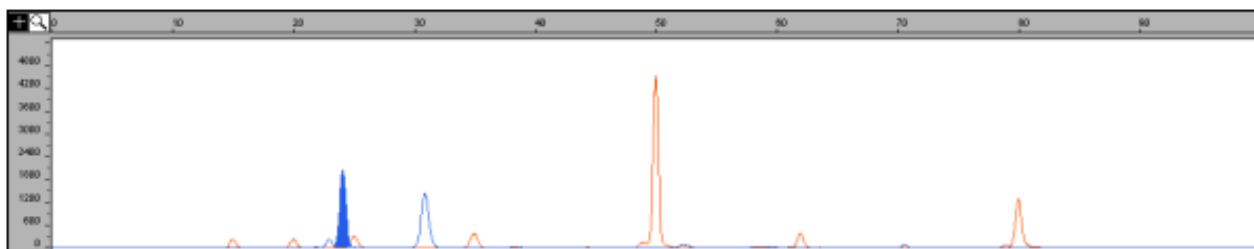


Análisis de alcohol deshidrogenasa (ADH2* 3)

Caracterización de la mutación R369C del gen del alcohol deshidrogenasa. Los picos que aparecen resaltados representan la posición de migración del fragmento de DNA amplificado mediante PCR donde se localiza la mutación.

La observación de un único **pico de color AZUL** indica la presencia de una CITOSINA en la posición correspondiente del gen, lo cual revela la presencia de un residuo de ARGININA en posición 369 de la proteína, coincidente con el tipo HOMOCIGOTO NORMAL de alcohol deshidrogenasa.

3.2.6.5.3.2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE ALDEHIDO DESHIDROGENASA

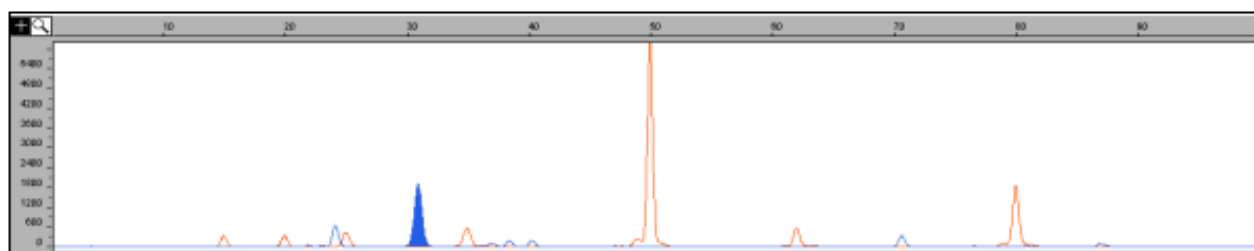


Análisis de aldehído deshidrogenasa (ALDH2)

Caracterización de la mutación E487K del gen del aldehído deshidrogenasa. El pico que aparece resaltado representa la posición de migración del fragmento de DNA amplificado mediante PCR donde se localiza la mutación.

La observación de un único **pico de color AZUL** indica la presencia de una GUANINA en la posición correspondiente del gen, lo cual revela la presencia de un residuo de GLUTÁMICO en posición 487 de la proteína, coincidente con el tipo HOMOCIGOTO NORMAL de aldehído deshidrogenasa.

3.2.6.5.3.3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CYP2E1

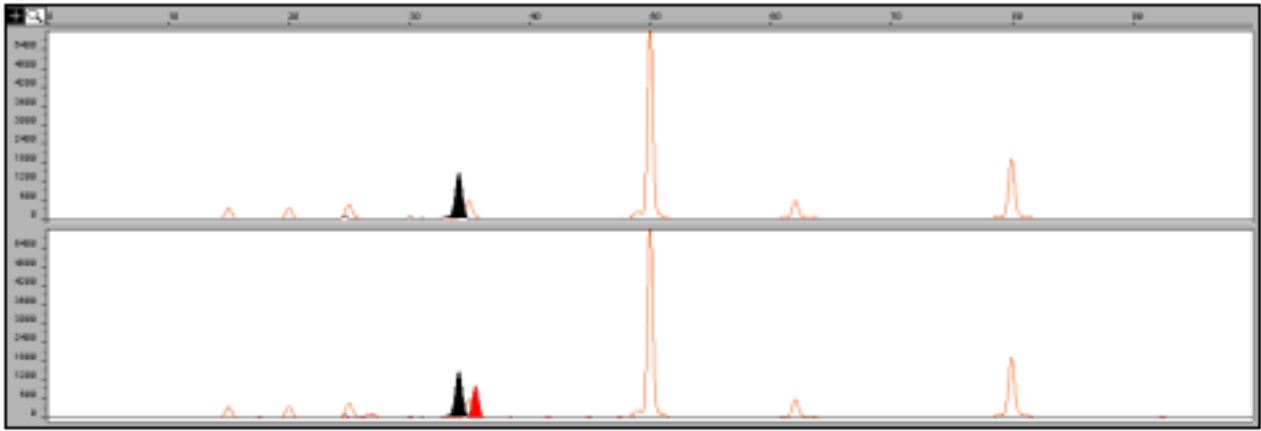


Análisis de la mutación *Pst* en la región de control del CYP2E1

Caracterización de la mutación *Pst* del gen del CYP2E1. El pico que aparece resaltado representa la posición de migración del fragmento de DNA amplificado mediante PCR donde se localiza la

mutación.

La observación de un único **pico de color AZUL** indica la presencia de una GUANINA en la posición correspondiente del gen, lo cual revela la presencia del tipo HOMOCIGOTO NORMAL de CYP2E1.



Análisis de la mutación *Rsa* en la región de control del CYP2E1

Caracterización de la mutación *Rsa* del gen del CYP2E1. El pico que aparece resaltado representa la posición de migración del fragmento de DNA amplificado mediante PCR donde se localiza la mutación.

La observación de un único **pico de color NEGRO** indica la presencia de una CITOSINA en la posición correspondiente del gen, lo cual revela la pre-

sencia del tipo HOMOCIGOTO NORMAL de CYP2E1.

La observación de un pico de **color NEGRO** y otro de **color ROJO** coincide con el tipo HETEROCI-GOTO de CYP2E1.

En todos los electroferogramas en **color NARAN- JA** aparecen los picos del patrón de tamaño empleado para identificar la ubicación de los picos de interés.

Nº biopsia	Conocida sólo por investigadores		
Edad	En años		
Sexo	Varón	Mujer	
Grupo según biopsia	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Consumo (CAGE+Historia clínica)	En UBES según clasificación del ministerio		
VHB	Positivo	Negativo	
VHC	Positivo	Negativo	
GOT	En UI/l	Valores referencia de HGUGM	
GPT	En UI/l	Valores referencia de HGUGM	
GGT	En UI/l	Valores referencia de HGUGM	
LEUCOCITOS	En mm3	Valores referencia de HGUGM	
BR	En mg/dl	Valores referencia de HGUGM	
ECOGRAFIA	Informe de Ecografía anterior a biopsia		
INFORME DE BIOPSIA	Informe del Departamento de A.Patológica del HGUGM		

Tabla 3.7. Protocolo de investigación empleado en el presente estudio.

3.3 Protocolo

Se reflejan todos los datos-valores de las variables en hoja de protocolo, siendo estrictos en el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión, así como en la recogida de datos de consumo (**Tabla 3.7**).

3.4. Análisis estadístico

3.4.1 Tipo de estudio y técnicas estadísticas

En el presente estudio se ha realizado un estadística descriptiva, describiendo las variables medidas de forma cuantitativa mediante la media, desviación típica y rango. Para las categóricas se presentan con frecuencias absolutas y porcentajes.

En el presente trabajo se han determinado las prevalencias de las mutaciones con sus correspondientes intervalos de confianza al 95%.

Se ha realizado una estadística analítica explorando asociaciones entre las diferentes variables medidas y la presencia o no de HAA, utilizando la chi cuadrado (**Mantel-Haenszel**) o su equivalente no paramétrico (prueba de Fisher) cuando era preciso y la t de Student o la U de Mann-Whitney (si era preciso). Se ha calculado la OR (odds ratio) y su intervalo de confianza al 95% ajustando posteriormente mediante una regresión logística (método ENTER) para controlar posibles factores de confusión con aquellas variables que resultaron en el análisis bivalente con una $p < 0,10$.

3.4.2 Programa informático

El programa utilizado ha sido el paquete estadístico SPSS 11.0 para Windows.

3.5. Ética

Esta investigación se ha realizado con plena aceptación de las normas éticas vigentes (Declaración

de Helsinki, revisión de Edimburgo 2000) y respetando todos los aspectos establecidos en la legislación vigente en materia de investigación clínica: Convenio para la protección de los Derechos Humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina. Convenio relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina.

4. Resultados y discusión

4.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS, DE CONSUMO y VÍRICAS

Las características de los cuatro grupos que se han estudiado han quedado reflejadas en **Tabla 4.1**.

No existían diferencias en cuanto a edad media entre los cuatro grupos, si cierto predominio de varones en el grupo 2 y 3, lo que coincide con lo referido en la literatura en cuanto al predominio de varones en la hepatopatía alcohólica (**Montull S 1989, Parés A 1986, Lindros KO 1995**). El consumo excesivo era el más prevalente tanto en el grupo 2 (63,7%) como en el 3 (87%). El VHC era más prevalente en el grupo 2, lo cual se debía a las características de la serie estudiada y se ha tenido

en cuenta en la realización del estudio estadístico.

4.2 MARCADORES BIOLÓGICOS CLÁSICOS DE ETILISMO Y HEPATOPATÍA

El empleo de marcadores biológicos, entendido el concepto como un parámetro, estructura o proceso que puede ser monitorizado en el organismo humano, se presenta como un factor fundamental en medicina. Su utilización se presenta actualmente como un factor clave en clínica, habida cuenta del tipo de información que pueden proporcionar en el diagnóstico y seguimiento de determinados procesos patológicos. Tanto el alcoholismo como la enfermedad hepática alcohólica es una patología infra-diagnosticada en la mayoría de los pacientes hospitalizados y ambulatorios, debido en gran

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Edad (años), media (D.S.)	43,4+/- 12,9	48,7+/- 9,3	46,1+/- 10,1	38,7+/- 12,2
Sexo, N (%)				
Hombres	28 (50,0)	27 (81,8)	19 (61,2)	36 (50,0)
Mujeres	28 (50,0)	6 (18,2)	12 (38,8)	36 (50,0)
Consumo de alcohol (UBES/día), N (%)				
0	56 (100)	0 (0)	0 (0)	-
3 – 8 (Hombres); 3 – 6 (Mujeres)	0 (0)	12 (36,3)	4 (13,0)	-
> 8 (Hombres); > 6 (Mujeres)	0 (0)	21 (63,7)	27 (87,0)	-
VHB positivo, N (%)	35 (62,5)	4 (12,1)	1 (3,2)	0 (0)
VHC positivo, N (%)	34 (60,7)	15 (45,5)	2 (6,4)	0 (0)

Tabla 4.1: Principales características de variables demográficas, de consumo de etanol y víricas de los grupos estudiados. VHB = virus de hepatitis B; VHC = virus de hepatitis C.

parte al ocultamiento de la ingesta alcohólica de forma total o parcial, así como por la preocupación e interés de los médicos más por sus consecuencias que por el origen de las mismas, como por ejemplo delirium tremens, politraumatismos, descompensación edema ascítica etc... (**Bush B 1987, Cleary PD 1988, Wetterling T 1998**). Esta situación de ocultamiento del "alcoholismo" se acentúa en determinados grupos de edad como los ancianos, grupo poblacional cada vez más amplio. Así, algunos autores consideran que el 13 % de la población geriátrica bebe lo suficiente para estar dentro del riesgo de adquirir una enfermedad hepática alcohólica en fases avanzadas (fibrosis-cirrosis) (**Potter JR 1987, Tamame E 1988, Herrera A 1999**). Otro grupo que especialmente infravalora su consumo es el comprendido entre los 18-30 años, lo cual lo hace especialmente vulnerable. Por tanto, en el caso concreto del abuso de alcohol y enfermedad hepática alcohólica, el empleo de marcadores clásicos, del tipo de los parámetros bioquímicos, tiene un valor insustituible en cuanto a la detección, pero sobre todo en el seguimiento y control de la abstinencia (**Conigrave KM 1995, Casado A 1996, Sillanauke P 2001**), si bien hay autores que creen que su valor en la detección es limitado (**Wetterling T 1998**). Muchos marcadores clásicos empleados en los procesos de detección del etilismo, proporcionan una información de tipo indirecto, es decir cuando el órgano está dañado y su función biológica está alterada, con lo cual es difícil delimitar si su elevación es por consumo de alcohol sólo y/o por el órgano dañado. El principal ejemplo lo constituye el estudio de las enzimas hepáticas, donde una alteración de sus niveles indica la existencia de un daño celular o tisular y que en ocasiones es irreversible. Los test enzimáticos solicitados para el diagnóstico de enfermedad hepática alcohólica determinan la actividad de los enzimas liberados al plasma como resultado de la

muerte celular, de daño causado por el deterioro de sus funciones o por enfermedad hepática ya instalada. La actividad enzimática es el resultado de tres componentes básicos, a saber:

- 1º. La tasa de liberación de las enzimas desde las células.
- 2º. Su volumen de distribución en el espacio extracelular.
- 3º. La tasa de eliminación del plasma por catabolismo o excreción.

Es importante resaltar así mismo que la determinación analítica puede resultar afectada por la presencia en plasma de factores activadores o inhibidores de la actividad enzimática, y por las variaciones pre-analíticas consistentes en la temperatura de almacenaje, hemólisis por mala manipulación de la muestra etc..

Los incrementos en la liberación de enzimas hepáticas se producen por:

- Necrosis severa o daño celular que ocurre tras isquemia, por tóxicos o infección, liberando fundamentalmente enzimas citoplásmicos.
- Incremento en la tasa de recambio celular, como ocurre en períodos de crecimiento, embarazo o en tumores hepatobiliares.
- Incremento de la síntesis intracelular por determinadas drogas o fármacos.
- Obstrucción de conductos biliares.

Las enzimas GOT, GPT se incluyen generalmente en las peticiones de test bioquímicos pero ninguno de ellos es específico por sí mismo para ninguna enfermedad hepática concreta, a ellas se une la GGT, pudiendo en algunos casos no reflejar el proceso completo, pues solo sirven como marcadores puntuales de enfermedades hepáticas y no señalan las reservas en las funciones de síntesis y

metabolismo propiamente hepáticos. El VCM utilizado fundamentalmente como medida del tamaño medio de los hematíes, se vienen utilizando como marcador de rasgo en las últimas décadas, basándose en la alteración que produce el alcohol sobre los hematíes (**Conigrave KM 1995, Sillanaukee P 1998, Yersin B 1995**).

Los estudios sobre marcadores de etilismo tienen algunas limitaciones, que hay que encuadrar en el contexto de cada uno, es decir, en función de medios empleados, población general u hospitalaria estudiada, lo cual no les resta valor a la validez de sus resultados. Entre estas limitaciones se encuentran las siguientes:

La mayor parte de los marcadores biológicos de consumo de alcohol se basan en la detección de las alteraciones que el alcohol produce sobre diferentes estructuras celulares, principalmente hepatocito y hematíes. Esto origina importantes inconvenientes, de un lado indican la afectación de un determinado órgano, con lo que pueden dar falsos positivos cuando la afectación no sea debida al consumo etílico, de otra parte, la sensibilidad de dichos marcadores aumenta cuando dichos órganos están suficientemente afectados, de ahí que no sean buenos marcadores de abuso etílico en las primeras fases o en los casos de ocultamiento o bajo consumo (fundamentalmente cuando este es inferior a 3 UBES); la mayoría de los estudios se basan en población hospitalaria o unidades de alcoholismo, con lo que la extrapolación de los datos debe ser cautelosa por dos motivos, a saber, la población estudiada puede presentar aumento de VCM y transaminasas por causas ajenas al consumo de alcohol como consumo de fármacos, anemias, sepsis, insuficiencia cardíaca etc... (**Casado M 1996**); no se concreta mediante criterio histológico el grado de enfermedad hepática alcohólica

de los pacientes bebedores; y un aspecto fundamental que se ha constatado es que el rango considerado como punto de “corte” de valor normal/ patológico varía según cada autor.

La principal ventaja de estos marcadores clásicos se basa en su utilidad para el diagnóstico de sospecha de enfermedad hepática alcohólica, teniendo en cuenta que no todos los consumidores excesivos de alcohol desarrollan enfermedad hepática alcohólica crónica, ni todos los pacientes con enfermedad hepática alcohólica en sus diversos estadios desarrollan HAA. Estas circunstancias hacen por lo tanto, muy conveniente, el estudio de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los marcadores biológicos clásicos como valores demostrativos de la eficacia de los mismos.

En el presente estudio se ha determinado la eficacia de los marcadores clásicos mediante la comparación de los resultados en diversas situaciones:

1º Correlación entre consumos de alcohol en pacientes hospitalarios con diversos tipos de hepatopatía y diferentes marcadores biológicos de etilismo- hepatopatía:

Se han estudiado y comparado tres grupos de pacientes hospitalarios: pacientes con hepatopatías o en estudio de posible hepatopatía no relacionadas con el alcohol (abstemios), pacientes con enfermedad hepática alcohólica sin HAA (bebedores moderados y excesivos), pacientes con enfermedad hepática alcohólica y HAA asociada (bebedores moderados y excesivos).

2º Eficacia de los marcadores biológicos para diagnosticar diferentes grados de consumo:

A) Eficacia para diagnosticar bebedores moderados-altos frente a abstemios: Se han compa-

rado en el presente estudio pacientes con consumos de alcohol moderados-altos frente a abstemios, excluyendo los pacientes con biopsias normales, todo ello valorando la eficacia de los marcadores biológicos clásicos como parámetros marcadores de etilismo.

B) Eficacia para diagnosticar bebedores excesivos frente a bebedores moderados-altos y abstemios:

Se han comparado en el presente estudio pacientes con consumos de alcohol excesivo frente a bebedores moderados-altos y abstemios, excluyendo los pacientes con biopsias normales, con el fin de valorar sensibilidad, especificidad, y valores predictivos de estos parámetros como marcadores de etilismo.

3º Eficacia de los marcadores biológicos clásicos para diagnosticar hepatopatía alcohólica frente a hepatopatía no alcohólica:

Se ha valorado la posible existencia de diferencias entre los marcadores en el caso de enfermedad hepática alcohólica (grupo 2) respecto a pacientes abstemios con hepatopatía no alcohólica (grupo 1).

4º Evaluación de la eficacia de marcadores clásicos, leucocitos y BR para el diagnóstico de HAA:

Se ha valorado las diferencias en estos parámetros entre los grupos 2 y 3, por tanto en dos estadios histológicos diferentes de una misma enfermedad, con el objetivo de establecer la eficacia de los mismos en pacientes bebedores.

4.2.1 Correlación entre consumos de alcohol en pacientes hospitalarios con diversos tipos de hepatopatía y diferentes marcadores biológicos

de etilismo- hepatopatía:

A) Los resultados obtenidos en los valores medios de las determinaciones de VCM, transaminasas y GGT aparecen sintetizados en las Tablas 4.2, 4.3, 4.4.

	CONSUMO DE ALCOHOL (UBES/día)	SEXO (H/M)	VCM (fl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	GGT (U/l)
GRUPO 1	0	28/28	89+/- 4	47+/- 38	75+/- 84	50+/- 46
GRUPO 2	9,5 ± 2,9	27/6	95+/- 9	71+/- 51	68+/- 64	183 +/- 277
GRUPO 3	10,2 ± 2,2	19/12	103+/- 8	160 +/- 8	72+/- 80	274+/- 372

Tabla 4.2: Datos clínicos y valores medios analíticos de VCM, GOT, GPT y GGT en los grupos de pacientes estudiados. Los resultados aparecen reflejados como la media ± SD.

Varones/ GRUPOS	Consumo alcohol (UBES/día)	VCM (fl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	GGT (U/l)
GRUPO 1	0	89+/- 4	40+/- 31	70+/- 80	45+/- 53
GRUPO 2	9,7 ± 2,9	97+/- 14	65+/- 38	82+/- 63	157+/- 18
GRUPO 3	10,2 ± 1,9	101+/- 8	138+/- 49	78+/- 96	276+/- 45

Tabla 4.3: Datos clínicos y valores medios analíticos de VCM, GOT, GPT y GGT en varones de los grupos de pacientes estudiados. Los resultados aparecen reflejados como la media ± SD.

Mujeres/ GRUPOS	Consumo alcohol (UBES/día)	VCM (fl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	GGT (U/l)
GRUPO 1	0	89+/- 5	55+/- 43	81+/- 89	56+/- 37
GRUPO 2	8,5 ± 3,3	95+/- 8	72+/- 54	65+/- 65	301+/- 54
GRUPO 3	10,2 ± 2,6	106+/- 10	197 +/- 125	64+/- 49	272+/- 18

Tabla 4.4: Datos clínicos y valores medios analíticos de VCM, GOT, GPT y GGT en mujeres de los grupos de pacientes estudiados. Los resultados aparecen reflejados como la media ± SD.

B) Los resultados de las comparaciones múltiples en **Tabla 4.5**

TEST INDEPENDIENTES SIMPLES: COMPARACIÓN GRUPOS 1, 2 y 3		
	F	SIG. (p)
VCM	37,7	,000
GOT	37,65	,055
GPT	0,94	,910
GGT	9,29	,000

Tabla 4.5: Comparación de marcadores entre los tres grupos y significación estadística.

C) Las características de las biopsias en grados: normal, leve, moderada, fibrosis y cirrosis en **Tabla 4.6**.

BIOPSIA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	TOTAL
NORMAL	11	0	0	11
% dentro de biopsia	100 %	0 %	0 %	100 %
% dentro de grupo	19,6 %	0 %	0 %	9,2 %
LEVE	37	13	2	52
% dentro de biopsia	71,2 %	25 %	3,8 %	100 %
% dentro de grupo	66,1 %	39,4 %	6,5 %	43,3 %
MODERADA	3	6	3	12
% dentro de biopsia	25,2 %	50 %	25,0 %	100 %
% dentro de grupo	5,4 %	18,2 %	9,7 %	10,0 %
FIBROSIS	2	8	5	15
% dentro de biopsia	13,3 %	53,3 %	33,3 %	100 %
% dentro de grupo	3,6 %	24,2 %	16,1 %	12,5 %
CIRROSIS	3	6	21	30
% dentro de biopsia	10,0 %	20 %	70,0 %	100 %
% dentro de grupo	5,4 %	18,2 %	67,7 %	25,0 %
TOTAL	56	33	31	120
% dentro de biopsia	46,7 %	27,5 %	25,8 %	100 %
% dentro de grupo	100 %	100 %	100 %	100 %

Tabla 4.6: Características histológicas de las biopsias de los pacientes estudiados.

1º VCM

Los resultados han mostrado que los valores medios de VCM determinados estuvieron por encima

de los valores de referencia en los GRUPOS 2 y 3. En el caso del grupo 1, de pacientes no alcohólicos, este parámetro no se eleva por encima de los valores de referencia, a pesar de que la mayoría de ellos está en estudio o con diagnóstico previo de hepatopatía virus C o B, con biopsias con **hepatopatía leve en el 66.1%**, moderada en el 5.4% y fibrosis-cirrosis en el 9%, presentando biopsia hepática **normal sólo en el 19.6%**, lo que permite inferir el valor del VCM como marcador de consumo, puesto que si no fuese así se hubiese elevado también en este grupo de pacientes con hepatía demostrada en biopsia en el 80,4 % del total. Tampoco se han encontrado diferencias en los valores de VCM entre varones y mujeres del grupo 1, ni al compararlos con los de los grupos 2 y 3 donde también por género se encuentran valores elevados por encima de los de referencia en estos grupos respecto al grupo 1. En el GRUPO 2 se detectaron valores de VCM superiores a 94 fl en 17 de los 33 (51.5%) sujetos estudiados mientras que en el GRUPO 3, en 25 de los 31 individuos analizados (80.6 %). Los resultados muestran (**Tabla 4.5**) una diferencia clínicamente relevante y estadísticamente significativa ($p < 0.001$) de los valores de VCM en grupo 2 y 3 o de pacientes con hepatopatía alcohólica respecto al grupo 1, de pacientes no bebedores, **lo que permite sugerir la utilidad del VCM como marcador de hepatopatía alcohólica y/o de consumo de etanol en pacientes con diverso grado de hepatopatía alcohólica en la biopsia hepática.**

2º GOT

En lo referente a la GOT, en 31 de 56 (55.3%) de los individuos analizados del GRUPO 1 se han determinado valores de actividad por encima de los de referencia, mientras que en los GRUPOS 2 y 3 estos valores fueron 28 de 33 (84.8%) y 30 de 31 (96.7 %) respectivamente. Los valores de referen-

cia encontrados en mujeres del grupo 2 (197+/-125 UI/l) son significativamente más elevados que los de los varones del mismo grupo, señalando el valor de dicho marcador en cuanto a daño hepático, es decir, como marcador de enfermedad hepática alcohólica, lo cual no ocurre con la GPT, cuyos valores son algo más elevados en varones. Los resultados (**Tabla 4.5**) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 y 2 ($p < 0,055$), lo que sugiere una menor utilidad clínica de la GOT como marcador de etilismo y/o hepatopatía alcohólica.

3° GPT

Los análisis de GPT mostraron elevaciones por encima de los valores de referencia en 35 de 56 (62.5 %) de los pacientes de GRUPO 1, en 19 de 33 (57.5 %) de los de GRUPO 2 y en 24 de 31 (77.4 %) de los de GRUPO 3. Al comparar los grupos 1 y 2 tampoco se han encontrado en el presente estudio diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,910$), lo cual nos indica la menor utilidad de la GPT, al igual que la GOT, como marcador de etilismo y/o hepatopatía alcohólica. Por tanto sólo señalarían daño celular hepático, pero sin discriminar tipo de hepatopatía ni si existe o no consumo de alcohol relacionado.

4° GGT:

Por su parte, se hallaron valores de GGT elevados

con respecto a los de referencia (61 y 31 UI/l en varones y mujeres respectivamente) en 25 de 56 (44.6 %) de sujetos del GRUPO 1, en 24 de 33 (72.7 %) del GRUPO 2 y en 27 de 31 (87.1 %) de los del GRUPO 3. Al comparar los valores de GGT por sexos, se observa una elevación más marcada de este parámetro en las mujeres del grupo 2 respecto a los varones del mismo grupo (301+/-54 UI/l vs 157+/- 18), indicando la mayor afectación hepática por alcohol en las mujeres respecto a los varones. En el grupo 3 no se han encontrado diferencias en cuanto a género en los valores de GGT (276+/- 45 UI/l en varones vs 272 +/- 18 UI/l en mujeres) revelando que en la HAA estos valores se elevan por encima de los valores de referencia en ambos sexos. La GGT se mostró (**Tabla 4,5**) como un marcador clínicamente relevante y estadísticamente sig-

MARCADORES	VARONES (n = 12)	MUJERES (n = 4)
VCM	98+/- 6	96+/- 5
GOT	80+/- 64	176+/- 255
GPT	109+/- 117	47 +/- 29
GGT	150+/- 147	119+/- 24

Tabla 4.7: Valores medios analíticos de VCM, GOT, GPT y GGT en bebedores moderados-altos. Los resultados aparecen reflejados como la media \pm SD.

nificativo para la detección de consumo de alcohol elevado y/o hepatopatía alcohólica ($p < 0,001$).

4.2.2 Eficacia de los marcadores biológicos para diagnosticar diferentes grados de consumo

A) Eficacia de los marcadores biológicos para diagnosticar bebedores moderados-altos frente a abstemios:

Se han determinado los valores de estos marcadores biológicos entre los bebedores moderados-altos diferenciando por género, lo cual queda reflejado en la **Tabla 4.7**.

No había diferencias entre los valores medios en VCM, si una mayor elevación de la GOT y GGT en mujeres respecto a varones, lo cual probablemente está relacionado con el mayor daño hepático por alcohol en el género femenino.

A partir de los resultados de los parámetros bioquímicos obtenidos, se ha estimado la eficacia de las distintas pruebas de laboratorio para identificar a los pacientes con consumo de alcohol moderado-alto (**Tabla 4.8**).

Marcadores biológicos	Consumo de etanol moderado-alto (* n° de individuos = 63)			Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo (%)	
	Si	No	Total			VPP	VPN
VCM							
Elevado	10	4	14	55 %	91 %	71 %	84 %
Normal	8	41	49				
Total	18	45	63				
GGT							
Elevado	14	22	36	77 %	51 %	39 %	85 %
Normal	4	23	27				
Total	18	45	63				
GOT							
Elevado	13	28	41	72 %	37 %	32 %	77 %
Normal	5	17	22				
Total 63	18	45	63				
GPT							
Elevado	14	33	47	78 %	27 %	30 %	75 %
Normal	4	12	16				
Total	18	45	63				
Alguna alteración bioquímica							
SI	51	87	138	100 %	8 %	37 %	100 %
NO	0	8	8				
Total	51	95	146				

Tabla 4.8 Eficacia diagnóstica de las pruebas de laboratorio para identificar consumos de alcohol moderados-altos en pacientes con biopsia con hepatopatía

*Se han excluido en esta valoración los pacientes cuyo resultado de la biopsia era normal, puesto que la inclusión de los mismos hubiese supuesto un sesgo en los resultados al establecer comparaciones entre grupos de pacientes con histología hepática normal con otros bebedores todos ellos con histología hepática alterada.

B) Eficacia para diagnosticar bebedores excesivos frente a bebedores moderados-altos y abstemios: Se han determinado los valores de estos marcadores biológicos entre los bebedores excesivos, diferenciando por género, lo cual queda reflejado en la **Tabla 4.9**.

Destacan los valores más elevados de GGT en mujeres respecto a varones, y en general de todos los marcadores, tanto de las transaminasas como

MARCADORES	VARONES (n=34)	MUJERES (n=14)
VCM	98+/- 9	105+/- 12
GOT	106+/- 59	146 +/- 63
GPT	57 +/- 57	77 +/- 57
GGT	227 +/- 371	328+/- 363

Tabla 4.9: Valores medios analíticos de VCM, GOT, GPT y GGT en bebedores excesivos. Los resultados aparecen reflejados como la media \pm SD.

del VCM, reflejando el mayor daño hepático en las mujeres derivado del consumo.

También se ha determinado la eficacia de los mismos a partir del cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos (**Tabla 4.10**).

Marcadores biológicos	Consumo de etanol excesivo (**n° de individuos =109)			Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo (%)	
	Si	No	Total			VPP	VPN
VCM							
Elevado	33	14	47				
Normal	13	49	62	72 %	78 %	70 %	79 %
Total	46	63	109				
GGT							
Elevado	36	36	72				
Normal	10	27	37	78 %	43 %	50 %	73 %
Total	46	63	109				
GOT							
Elevado	42	41	83				
Normal	5	21	26	89 %	34 %	51 %	81 %
Total 109	47	62	109				
GPT							
Elevado	29	47	76				
Normal	17	16	33	63 %	25 %	38 %	48 %
Total	46	63	109				
Alguna alteración bioquímica							
SI	139	134	273				
NO	3	8	11	97 %	5 %	51 %	73 %
Total	142	142	284				

Tabla 4.10: Eficacia diagnóstica de las pruebas de laboratorio para identificar a los bebedores excesivos en pacientes con biopsia con hepatopatías

** Se han excluido en esta valoración los pacientes cuyo resultado de la biopsia era normal, puesto que la inclusión de los mismos hubiese supuesto un sesgo en los resultados al establecer comparaciones entre grupos de pacientes con histología hepática normal con otros bebedores todos ellos con histología hepática alterada.

Los resultados obtenidos han mostrado que en este grupo de pacientes con diferente tipo de hepatopatía, el marcador biológico de consumo de etanol más compensado es el VCM habida cuenta de los VPP calculados, donde el 71 % de los pacientes bebedores moderados- altos y el 70 % de los excesivos, fueron correctamente identificados. Por otro lado se ha señalado que los VPN del VCM son del 84% y 79 % identificando correctamente a los abstemios, **es decir, que el VCM se ha mostrado como un marcador útil para identificar consumos moderados y excesivos, así como sus valores normales para descartar el consumo.** En cuanto a las transaminasas y GGT se muestran como marcadores útiles en cuanto a descartar consumo en función de los VPN elevados calculados, pero no son eficaces en cuanto a especificidad y VPP, todos ellos igual o inferiores al 50 %. La utilización conjunta de los marcadores biológicos clásicos permite una correcta identificación de los abstemios (100% de VPN en la comparación de bebedores moderados-altos frente a abstemios).

Los resultados obtenidos comparados con los resultados de eficacia de estos marcadores en la detección de individuos bebedores en población hospitalaria y población general muestran diferencias (**Sillanaukee P 2001, Reynaud M 2000, Wetterling T 1998, Aubá J, 1993**). Se han comparado los resultados con los obtenidos por otros autores, si bien la mayoría de las diferencias se basan en la metodología, bien en el rango considerado como valor patológico de cada parámetro, bien en la edad media o bien en el grupo

de pacientes estudiado. Se han comparado los resultados obtenidos en bebedores moderados-altos y excesivos con otros autores y se han observado semejanzas y algunas diferencias.

Musshoff F 1998 realiza una revisión de sensibilidad y especificidad de marcadores de consumo de alcohol basándose en los datos de diversos estudios. Este autor encuentra una especificidad del 90 % en la GOT, pero considera como rango normal < 18 U/l, frente a la señalada en el presente estudio de 37 % en bebedores moderados-altos y 34 % en bebedores excesivos. La especificidad encontrada es menor para la GGT (70 %) y VCM (60-90%) empleando valores de GGT normales de < 28 U/l, inferiores a los del presente estudio y de VCM < 100 fl, siendo en el presente estudio inferior la sensibilidad de la GGT e igual o superior en el caso del VCM, tanto en bebedores moderados-altos (91 %) como en excesivos (78 %), coincidiendo en la gran utilidad del mismo para el diagnóstico de consumo de alcohol. Este autor señala la elevada especificidad de las transaminasas y sobre todo del cociente GOT/GPT > 2 para el diagnóstico del daño hepático alcohólico. Otras diferencias del presente estudio con este autor así como por **Gilt T 1995** se basan en la ausencia de diferenciación por género de GGT y transaminasas, lo cual creemos que es un factor a considerar en la valoración de los mismos, lo cual no resta importancia a lo referido por estos autores.

Allen J 2000 realiza una revisión de los marcadores de etilismo en mujeres, a partir del análisis de diferentes estudios. Este autor también señala que es importante de cara a la sensibilidad y especificidad una buena caracterización de los criterios de bebedores como de riesgo o excesivos. Encuentra una sensibilidad para la GGT en su revisión de 53-54% para mujeres bebedoras excesivas, en ambos casos inferiores al presente estudio tanto para bebedores moderados-altos (77%) como excesivos (78%). La especificidad

encontrada es mucho mayor (92-96%) cuando se usa conjuntamente con CDT pero sensiblemente menor en mujeres cuando se determina aisladamente la GGT sin combinarla con la CDT (44%) lo cual coincidiría con los resultados del estudio que se ha realizado tanto en bebedores moderados-altos (51%) como en excesivos (43%). Este último resultado hay que interpretarlo desde la perspectiva de que se han comparado pacientes todos ellos con hepatopatías en las biopsias, y se han excluido aquellos con biopsias normales, por lo que el criterio del que se ha partido en el presente estudio es el histológico, lo cual no es común en la literatura, pero es necesario señalarlo para enmarcar cada estudio en un contexto determinado. **Allen J 2000** señala unas sensibilidades de VCM en su revisión en torno a 52-63%, similar a nuestro grupo de consumo moderado-alto (55%) pero inferior al de consumo elevado (72%). Este autor critica otros estudios ya que no especifican el consumo de alcohol de forma concreta, ni el diagnóstico de alcohol-dependencia, lo cual puede ser de gran importancia debido a que es clave concretar el consumo.

Hermansson U 2000 realiza un estudio de identificación precoz (screening) de abuso de alcohol en población laboral utilizando marcadores psicométricos (AUDIT), CDT y GGT. La mayoría eran varones (63%) y la edad media era similar a la de los grupos del presente estudio (43+/- 10 años). Para la GGT emplea los

siguientes valores como de referencia: < 1.3 microkatal /l (equivale a < 78 UI/l) para varones y < 0.8 microkatal /l (< 48 UI/l) para mujeres. Concluye que si a la CDT y AUDIT se le une la GGT el porcentaje de positivos (población laboral que abusa de alcohol) detectados (sensibilidad) pasa de 18% a 22 %. La sensibilidad señalada es baja si bien sería explicable porque los valores de referencia de GGT empleados por este autor son algo elevados en comparación con el presente estudio, tanto en lo referido a varones como a mujeres, y porque la población estudiada es población general y no hospitalaria como en el presente estudio.

Sillanaukee P (2001) revisa 6 estudios comparando GGT y CDT (total de 1412 pacientes, 2 estudios de Alemania, 1 de España, 1 Francia, 1 Finlandia, 1 Japón). Clasifica a los pacientes en dos grandes grupos: 1º Bebedores sociales (consumo inferior a 6 UBES/día) si bien con grandes variaciones entre estos estudios (desde <1,5 UBES /día hasta 6 UBES/día 2º Bebedores excesivos (consumo superior a 6 UBES/día). El predominio por sexos es de varones de forma global (85 %), los valores de referencia empleados por estos estudios son: 40 UI/l GGT para varones y 30 UI/l para mujeres. Los valores medios encontrados por estos estudios para los diferentes marcadores quedan reflejados en **Tabla 4.11**.

MARCADORES BIOQUÍMICOS	BEBEDORES EXCESIVOS		BEBEDORES SOCIALES	
	VARONES	MUJERES	VARONES	MUJERES
GGT (UI)	108 +/- 203	125 +/- 232	13 +/- 11	22 +/- 24
GOT (UI)	37 +/- 51	38 +/- 41	16 +/- 18	19 +/- 9
GPT (UI)	27 +/- 26	33 +/- 31	13 +/- 10	21 +/- 15
VCM (fl)	95 +/- 7	95 +/- 8	91 +/- 4	90 +/- 4

Tabla 4.11: Valores medios de marcadores biológicos en bebedores excesivos y bebedores sociales diferenciando por sexos. (Tomado de Sillanaukee P 2001).

MARCADORES	BEBEDORES-MODERADOS-ALTOS (V)	BEBEDORES-MODERADOS-ALTOS (M)	SILLANAUKEE VARONES	SILLANAUKEE MUJERES
GGT	150+/- 147	119+/- 24	108+/- 203	125+/- 232
GOT	80+/- 64	176+/- 255	27 +/- 26	33 +/- 31
GPT	109+/- 117	47 +/- 29	37 +/- 51	38 +/- 41
VCM	98+/- 6	96+/- 5	95 +/- 7	95+/- 8

Tabla 4.12: Resultados comparados de los valores medios+/-SD del presente estudio frente a los hallados por Sillanaukee P, diferenciando por género.

Los valores medios encontrados de estos parámetros son inferiores a los pertenecientes al grupo de no bebedores del presente estudio, lo cual se explica por la presencia de hepatopatías o hipertransaminemias en estudio en el grupo de no bebedores. Se han comparado los grupos de bebedores moderados-altos con los bebedores excesivos de estos estudios, así se han encontrado valores medios más altos en el grupo de bebedores moderados-altos frente a lo referido por **Sillanaukee P 2001** tanto en lo referido a varones como a mujeres, reflejado en la **Tabla 4.12**.

Se ha deducido que estas diferencias podrían deberse a la presencia de hepatopatía alcohólica en diversos grados en los bebedores del estudio que se ha realizado, a pesar de consumos iguales o inferiores en el presente estudio (< 8UBES varones y < 6 UBES en mujeres) respecto a > 6 UBES, aunque no especifica la cuantificación exacta en **Sillanaukee P 2001**. Si llama la atención los valores superiores de GGT en mujeres bebedoras excesivas de Sillanaukee P en comparación con las mujeres del grupo bebedoras moderadas-altas del estudio que se ha realizado, habiéndose empleando el mismo punto de corte de 30 UI/l. De ello podría deducirse la utilidad como marcador específico de etilismo en mujeres con o sin hepatopatía.

Reynaud M 2000 compara tres grupos: no alcohólicos (población general que acude a urgencias), consumo excesivo (pacientes hospitalizados, basándose en criterios médicos y DSM-IV) y dependientes (pacientes hospitalizados con síndrome de abstinencia alcohólica). Excluye en todos los casos aquellos que toman medicación susceptible de modificar valores de los marcadores, embarazadas, enfermedades que puedan modificar los valores de los marcadores. En el grupo de no bebedores incluye pacientes que beben menos de 3 UBES alcohol al día. Este autor hace una revisión muy exhaustiva de GGT, VCM y CDT, si bien hay algunos aspectos que se han mostrado como difíciles de entender, por ejemplo la supuesta exclusión de pacientes en urgencias con enfermedades o medicaciones que aumenten la GGT, lo cual es difícil de recoger en dicha situación. Adicionalmente podría haber sido interesante que hubiese calculado los valores de transaminasas y su eficacia. Tampoco es fácil de establecer la distinción entre abusadores y dependientes, sobre todo cuando no especifica la cantidad de alcohol al día ni el punto de corte en cuanto a consumo en estos dos grupos. Los valores de referencia empleados son similares a los presentes en cuanto a VCM < 98 fl, pero diferentes en cuanto a GGT < 40 U/l, sin establecer diferencia por género. La eficacia encontrada para

los diferentes parámetros por este autor es la siguiente comparada con los bebedores moderados-altos y excesivos de la serie presentada: Para VCM en el grupo de consumo excesivo no dependiente la especificidad es del 96% y el VPP del 63%, siendo similares a los que se han encontrado en el estudio presente en el grupo de bebedores moderados-altos (especificidad 91 %, VPP 71 %). Según este autor en el grupo de pacientes alcohol dependientes el VPP del VCM es de 81 %, superior al obtenido en el presente estudio en los bebedores excesivos (70 %) y moderados-altos (71 %). En cuanto a la GGT la sensibilidad en el grupo de consumo excesivo no dependiente es del 42 %, especificidad 76 %, VPP 61 %, que comparándolo con el grupo de bebedores moderados-altos del estudio presente, es más elevada en cuanto a especificidad (**Tabla 4.8**, especificidad de GGT 51 %), probablemente por las diferencias en cuanto a definición de consumo y niveles de referencia que se han empleado, más bajo en el caso de este autor.

Wetterling T 1998: Estudio de 231 pacientes hospitalizados en Medicina Interna o Cirugía de un hospital General en Alemania. Su estudio tienen como objetivo comparar las principales pruebas psicométricas con los marcadores clásicos de etilismo y CDT determinando sensibilidad, especificidad, VPP y VPN. En la metodología se han encontrado coincidencias como en el predominio de varones (130 varones y 74 mujeres), edad media (43.7 +/-15.1 años en varones, 43.1+/- 15.1 años en mujeres). A cada paciente se le determinaron marcadores y se les preguntó el CAGE (**Mayfield DG 1974**) y MALT (**Selzer ML 1971**). Divide a los pacientes en aquellos con problemas relacionados con el alcohol, para su definición consideran un nivel de consumo igual o superior a 7 UBES/día en varones y 4 UBES/día en mujeres, equivaldrían a bebedores altos y excesivos según clasificación

del MSC y abstemios o bebedores ligeros (176 pacientes). Se diferencia del presente estudio donde se ha excluido consumos inferiores a 3 UBES/día). En todos los casos el consumo se determinaba en función de la frecuencia y cantidad consumida en las cuatro últimas semanas previas al ingreso hospitalario, no especificando el tiempo de consumo de alcohol en cuanto a duración en años. El consumo en los varones de forma global era superior al de las mujeres (4 UBES +/-8 UBES/día vs 2 +/-3 UBES/ día), llamando la atención la elevada desviación estándar en ambos grupos. Los valores de referencia, como "punto de corte", utilizados para los marcadores clásicos son diferentes a los que se han empleado en el estudio, y en la mayoría inferiores salvo igual en el VCM. Así, este autor emplea los siguientes: GGT (>28 U/l varones, 19 U/l mujeres), GOT (>19 U/l varones, > 15 U/l mujeres), GPT (> 22 U/l varones, > 18 U/l mujeres), >94 fl para VCM. Los resultados reflejados en **Tablas 4.13 y 4.14**

Parámetros bioquímicos	Abstemios/bebedores ligeros	Bebedores excesivos	Test (p)
n (%)	174 (85.3%)	30 (14.7 %)	
GGT	36+/- 53	183+/-209	< 0.05
GOT	15+/- 21	34+/-45	<0.01
GPT	23+/-46	32+/-24	<0.01
VCM	90+/-5	95+/-5	<0.01
UBES/día	1+/-2	8+/-12	<0.01

Tabla 4.13: Parámetros bioquímicos clasificados por categorías de pacientes según test de CAGE. (Tomado de **Wetterling T 1998**).

Cuestionario/Parámetro bioquímico	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
CAGE	49.1	98	90	83.9
MAST	47.3	98.7	92.9	83.5
GGT	57.6	69.5	47.5	77.4
GOT	33.0	88.3	57.5	78.0
GPT	40.9	81.9	51.9	74.3
VCM	33.3	88.4	52.8	77.9

Tabla 4.14: Eficacia de parámetros psicométricos y bioquímicos para el diagnóstico de alcohol dependencia. (Tomado de **Wetterling T 1998**).

Se han comparado los valores de marcadores en los bebedores excesivos de este autor respecto a los que se han determinado en este estudio en bebedores moderados-altos y excesivos, y se ha observado valores más bajos para todos los marcadores salvo para la GGT, lo que indica la utilidad del mismo como marcador de consumo, explicándose las diferencias por la presencia de HAA y hepatopatía avanzada en los pacientes bebedores del estudio que se ha realizado, reflejado en **Tabla 4.15**.

MARCADORES	EBEDORES- MODERADOS ALTOS VARONES	BEBEDORES MODERADOS- ALTOS MUJERES	BEBEDORES EXCESIVOS (Wetterling)
GGT	150+/-147	119+/- 24	183+/- 209
GOT	80+/- 64	176+/- 255	34+/- 45
GPT	109+/-117	47 +/- 29	32+/- 24
VCM	98+/- 6	96+/- 5	95+/-5

Tabla 4.15: Tabla comparativa de los resultados encontrados por Wetterling T 1998 frente al presente estudio.

También se han encontrado diferencias en los valores de eficacia obtenidos por este autor respecto al estudio que se ha realizado. Si comparamos la eficacia de los distintos parámetros con los de los bebedores moderados-altos y excesivos del estudio que se ha realizado se han encontrado las siguientes diferencias y similitudes:

1 ° VCM: Reflejadas en **Tabla 4.14** encuentra los siguientes valores de eficacia de este parámetro: sensibilidad (33.3 % vs 55% bebedores moderados-altos, 72% bebedores excesivos), especificidad (88 % vs 91 % bebedores moderados-altos, 78 % bebedores excesivos). En VPP y VPN las diferencias son muy acentuadas en el VPP (52 % vs 71 %-70 %) lo cual se puede explicar por las dife-

rencias en la población hospitalaria estudiada, ya que este autor no concreta que tipo de patología padecen los pacientes, ni especifica si presentan o no hepatopatía alcohólica concomitante. En cuanto al VPN el grado de coincidencia es mayor (77.9 % vs 84 % en bebedores moderados-altos, 79 % en bebedores excesivos). Estos resultados le confieren al VCM un enorme valor para descartar consumo habida cuenta del VPN calculado, a pesar de lo cual este aspecto no es resaltado por este autor.

2° GGT: Los valores de eficacia (**Tabla 4.14**) comparados con los obtenidos en bebedores moderados-altos y excesivos del presente estudio son inferiores en cuanto a sensibilidad (57.6 % vs 77 % bebedores moderados-altos, 78% bebedores excesivos), parecidos en especificidad (69.5 % vs 51 % bebedores moderados-altos, 43 % bebedores excesivos), y VPP (47.5 % vs 39 % bebedores moderados-altos, 50 % bebedores excesivos), VPN (85.4 % vs 85 %, 73 %), siendo sólo coincidentes en el VPN (77.4 vs 75%, 73%), revelando el valor de la GGT como marcador para descartar consumo.

3° Transaminasas: Los valores de eficacia son similares para estos parámetros y muy inferiores a los del presente estudio, probablemente por la diferencia de pacientes y consumos. Se debe destacar la alta especificidad encontrada por este autor para las transaminasas siendo del 88% para GOT y del 81% para GPT, lo cual según el mismo les conferiría un alto valor para confirmar consumo, avalado también por sus VPN elevados para descartar el mismo entre los no bebedores en población hospitalaria. Este autor destaca la elevada especificidad de los test psicométricos tanto CAGE como MALT, así como su elevado VPN (91%) lo cual según el mismo los convierte en los principales instrumentos de detección de consumo, si bien habría que situarlos dentro del contexto de pacientes hospita-

lizados como punto de partida de estudio de este autor. También destaca las bajas sensibilidades de los marcadores clásicos (inferiores todos al 60%) como instrumentos de detección precoz de consumo en pacientes hospitalizados, pero no hace mención a los VPN y su importancia como elemento de “exclusión” de consumo entre estos pacientes. Además afirma que no son instrumentos válidos para detectar consumo mayor de 8 UBES /día durante las 3 últimas semanas, lo cual coincide con otros autores (**Blisson JI 1994**), si bien este aspecto es por un lado discutible por que contradice otros estudios (**Aubá J 1993, Conigrave KM 1995**) y por no especificar si antes de ese periodo, y durante al menos 5 años había habido o no consumo; por otro es comprensible, pues el valor de estos marcadores en cierto modo se derivaría del daño hepático producido por el alcohol, más que por un consumo en un periodo corto de tiempo.

Aubá J 1993 realiza un estudio de rendimiento de

las pruebas de laboratorio en la detección de bebedores en el medio laboral, concretamente en 550 empleados de la empresa de transporte metropolitano de Barcelona. Los datos de consumo los obtiene mediante entrevistas personales donde se cuantifica el consumo de alcohol en la última semana. El mismo autor de este artículo refiere que los datos de consumo están infraevaluados lo cual es asumido como hecho común por la mayoría de los autores (**Conigrave KM 1995, Allen J 2000**). Concluye que todas las pruebas de laboratorio presentan una correlación positiva débil con el consumo de alcohol. La mejor sensibilidad corresponde al VCM tanto en población con consumo semanal superior o igual a 4-6 UBES/día (bebedores ligeros-moderados según MSC) donde sería del 33% como en bebedores que llama excesivos con consumo semanal igual o superior a >6 UBES/día. Las mejores especificidades corresponden a la GGT (93 %) y GOT (97 %) en ambos grupos. Los resultados de este autor en **Tablas 4.16 y 4.17**.

	Consumo _ 4-6 UBES/día (n° de individuos)			Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo (%)	
	Si	No	Total			Positivo	Negativo
VCM							
Elevado	31	55	86	33	85	36	83
Normal	64	318	382				
Total	95	373	468				
GOT							
Elevado	6	9	15	10	97	40	82
Normal	56	261	317				
Total	62	270	332				
GPT							
Elevado	8	56	64	13	79	13	80
Normal	54	213	267				
Total	62	269	331				
GGT							
Elevado	10	19	29	16	93	35	83
Normal	52	251	303				
Total	62	270	332				
Alguna alteración bioquímica							
SI	38	106	144	37	75	26	82
NO	66	312	378				
Total	104	418	522				

Tabla 4.16: Eficacia diagnóstica de las pruebas de laboratorio para identificar a los bebedores excesivos con consumos iguales o superiores a 4-6 UBES/día. (Tomado de **Aubá J 1993**).

	Consumo \geq 6 UBES/día (n° de individuos)			Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo (%)	
	Si	No	Total			Positivo	Negativo
VCM							
Elevado	17	69	86	49	84	20	95
Normal	18	364	382				
Total	35	433	468				
GOT							
Elevado	5	10	15	21	97	33	94
Normal	18	298	317				
Total	24	308	332				
GPT							
Elevado	6	58	64	25	81	9	93
Normal	18	249	267				
Total	24	307	331				
GGT							
Elevado	6	23	29	25	93	21	94
Normal	18	285	303				
Total	24	308	332				
Alguna alteración bioquímica							
SI	20	124	144	50	74	14	95
NO	20	358	378				
Total	40	482	522				

Tabla 4.17: Eficacia diagnóstica de las pruebas de laboratorio para identificar a los bebedores excesivos con consumos \geq 6 UBES al día (Tomado de Aubá J 1993).

Retomando lo señalado por **Aubá J** y recientes autores en relación con estos marcadores clásicos de etilismo en población general y hospitalaria se ha valorado lo siguiente:

1º VCM:

La especificidad del VCM como marcador del consumo de etanol es muy similar en los grupos de población general y hospitalaria presentados cuando se comparan con el grupo aquí estudiado de pacientes bebedores moderados-altos con hepatopatías (**88% Humbert M, 84 % Aubá J vs 91%**) y con los pacientes con consumo excesivo y hepatopatías del presente estudio (78 %), sin embargo es un marcador mucho más sensible en pacientes con hepatopatías que en otros de población general (24 % sensibilidad de VCM en grupo de población general de **Reynaud M 2000**, 49% en **Aubá J 1993**, 30 % en **Conigrave KM 1995** 48 % en **Mundle G 1999**) mientras que es de 55% y 72% en los bebedores moderados-altos y excesivos respectivamente del estudio que se ha realizado. También es superior la sensibilidad del grupo de bebedores moderados-altos (55%) del presente estudio, con la encontrada por algunos autores en población hospitalaria de nuestro medio (33% en **Casado MA 1996**) quizás porque su punto de corte fue de 99 fl para este parámetro. **Aubá J 1993** refiere que los individuos de su estudio con valores de VCM superior al considerado normal (≥ 95 fl, igual al presente estudio) refieren un consumo semanal medio de alcohol puro significativamente mayor a las personas con VCM normal (< 95 fl) (25+/-20 UBES/día frente a 15+/- 14 UBES /día). Según este autor el 18% de la población estudiada presentó valores de referencia elevados para VCM, y si se admite como sospechosa de alcoholismo la elevación por encima de los valores de referencia el VCM y la GGT serían las pruebas más útiles. La sensibilidad mayor de los diversos pará-

metros corresponde según este autor a la VCM tanto para los bebedores ligeros (33%) como a los altos-excesivos (49%). Sin embargo como se ha podido observar su eficacia para detectar consumo en población laboral/general es baja. Si bien el VPN es elevado 83 % en bebedores ligeros-moderados, 95 % en bebedores altos-excesivos. **Estos valores sugieren la idea de la gran utilidad del VCM, sobre todo, para descartar el consumo habida cuenta del VPN calculado**, y como seguimiento y control de la abstinencia, tanto en población hospitalaria como general, sin embargo este aspecto no es señalado por este autor.

2º Transaminasas (GOT, GPT):

Del análisis de los valores de transaminasas, se observa que en la literatura revisada no son herramientas de gran utilidad en la detección de un consumo excesivo de etanol en población general. Así en el estudio de **Auba J 1993** la sensibilidad de GOT es de 21% y de GPT 25 %. En el estudio de **Conigrave KM 1995** la sensibilidad GOT y GPT son del 10-30 % (**Tabla 4.18**) frente a las sensibilidades más elevadas en los grupos de bebedores moderados-altos (72-78 % GOT-GPT) y excesivos

	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
GGT CONSUMO "RIESGO"	20-50	55-100
GGT DEPENDENCIA	60-90	55-100
VCM CONSUMO "RIESGO"	20-30	64-100
VCM DEPENDENCIA	40-50	64-100
GOT CONSUMO "RIESGO"	10-30	>90
GOT DEPENDENCIA	35-50	>90
GPT CONSUMO "RIESGO"	10-20	>80
GPT DEPENDENCIA	20-50	>80

Tabla 4.18: Valores de sensibilidad y especificidad de marcadores clásicos para la detección de diferentes grados de consumo. (Tomado de **Conigrave KM 1995**).

VALORES BIOQUÍMICOS	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %
GGT	30%	95%
GOT	52%	76%
GPT	38%	69%
VCM	33%	99%

Tabla 4.19: Valores de sensibilidad y especificidad de marcadores clásicos para la detección de diferentes grados de consumo. (Tomado de **Casado M.A 1996**).

(89-62 % GOT-GPT) del presente estudio.

Se deduce por tanto que son marcadores, en que la alteración de sus parámetros por encima de los valores de referencia, dan cuenta de la existencia de un daño hepático pero sin discriminar claramente la etiología de éste.

En cualquier caso, se observa que son técnicas mucho más específicas cuando se analizan en población general con consumos elevados de alcohol como en el estudio de **Auba J** (97% GOT, 81 % GPT) o en el de Wetterling T (88% GOT, 81 % GPT) que en los grupos de pacientes bebedores moderados-altos y excesivos con hepatopatía alcohólica del estudio que se ha realizado, revelando que en este grupo de pacientes, estos marcadores son indicativos, en general, de la existencia de un daño en la función hepática. Además hay que tener en cuenta que en la población laboral estudiada por **Aubá J** no especifica la presencia o no de hepatopatía alcohólica ni de otro origen. En cuanto a la sensibilidad se observan variaciones importantes entre los diferentes grupos. Por un lado, en población general, las transaminasas se muestran como marcadores poco sensibles, especialmente en pacientes con consumos inferiores a 4 UBES/día, aunque aumenta ligeramente en consumidores mayores de 6 UBES/día; esto indica que un alto porcentaje de bebedores no presentan niveles elevados de transaminasas. En el estudio que se ha realizado en aquellos pacientes con hepatopatías, se presentan aparentemente como pruebas mucho más sensibles, como ocurre en los

grupos de bebedores moderados –altos (**sensibilidad de GOT 72 % vs 21% en Aubá J, GPT 78 % vs 25 % en Aubá J**). Lo mismo se ha observado en el presente estudio en los resultados de bebedores excesivos con hepatopatías (sensibilidad de GOT 89 % vs 21 % en **Aubá J**, GPT 63 % vs 25 % en **Aubá J**). Adicionalmente no hay coincidencia del presente estudio con otros autores como **Casado MA1996 (Tabla 4.19)** que señalan una sensibilidad en pacientes hospitalizados de 52 % para GOT y 38 % para GPT, si bien en esta serie no se describe si presentan o no hepatopatía concomitante. Esto es coincidente también con series más antiguas (**Tabla 4.20**) donde se observa una sensibilidad baja de GOT y GPT en pacientes hospitalizados, en torno a 30- 43 %.

AUTORES	POBLACIÓN EN N° DE CASOS	PRUEBA	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
SPENCER -PEET ET AL 1972	PACIENTES PSIQUIÁTRICOS (167)	AUMENTO GGT	83	88
WU ET AL 1984	PACIENTES ALCOHÓLICOS (63)	AUMENTO VCM	89	-----
MORSEY HURT 1979	PACIENTES ALCOHÓLICOS (62)	AUMENTO VCM GGT GOT	26 63 30	-----
CHICK ET AL 1982	PACIENTES ALCOHÓLICOS Y POBLACIÓN LABORAL (522)	AUMENTO VCM+GGT	73	85
BERNAD T 1982	PACIENTES PSIQUIÁTRICOS (385)	AUMENTO VCM GGT GOT GPT	20 69 41 43	99 87 98 93
PAPOZ 1981	ADULTOS SANOS BEBEDORES (995)	AUMENTO VCM+GGT	77	94
ECKHARDT ET AL 1981	PACIENTES (251) HOSPITALIZADOS	AUMENTO DE VCM+GGT	77	95

Tabla 4.20: Eficacia en la detección de alcoholismo de los parámetros de laboratorio. (Tomado de Series diversas).

Retomando lo anterior, y en virtud de los VPP y VPN estimados en cada caso para la GOT y GPT, se percibe su gran valía sobre todo en los casos del control de la abstinencia, ya que en el caso de los individuos consumidores de etanol, se observa una alta proporción que no presenta niveles elevados de transaminasas.

3° GGT:

Por lo que respecta a la GGT en población general, se muestra como una prueba muy específica aunque poco sensible, sobre todo en consumos inferiores a 4 UBES/día. Por el contrario, en pacientes con hepatopatías, se muestra como una prueba mucho más sensible que las transaminasas si bien, menos específica. Hay autores como **Hillman A 1998** que señalan una serie de limitaciones de la GGT en sujetos alcohol-dependientes. Este autor realiza un estudio de 45 pacientes, mayoritariamente varones, atendidos en una Unidad de Alcoholismo, dividiéndolos en diversos grupos según los niveles de GGT, y comparando los resultados con la media de un cuestionario sobre dependencia alcohólica, así como determinando sus niveles semanalmente para relacionarlos con la abstinencia. Entre sus resultados más relevantes destaca que sólo el 49 % de los mismos tenían niveles de GGT superiores al punto de corte (< 50 UI/l varones y < 38 UI/l en mujeres), asimismo que los niveles se normalizan en la mayoría de los pacientes a las cuatro semanas de deshabituación salvo en aquellos con niveles superiores a 100 UI/l al ingreso en cuyo caso permanecen por encima del punto de corte expresando el daño la función hepática secundario al alcohol, lo cual se corroboraba con la

elevación de transaminasas (**Hillman A 1998**).

Todos estos resultados sugieren la idea ya señalada por diversos autores de que una utilización conjunta y simultánea de varias pruebas de este tipo pueden hacer sospechar la presencia de un caso de consumo excesivo de alcohol, o al menos, y en virtud de los niveles analíticos descartarlo (**Auba J 1993, Conigrave KM 1995, Mundle G 1999, Hermansson U 2000, Sillanaukee P 2001**).

Por último se podría señalar la **importancia de unificar criterios** en los diferentes estudios en cuanto: especificar consumo de alcohol, diferenciar correctamente los grupos de bebedores excesivos, señalar si padecen o no simultáneamente hepatopatía alcohólica, unificar valores de referencia de los marcadores, diferenciar los mismos por sexo y tener en cuenta la edad media a la hora de interpretar los resultados. Todo ello incrementaría el valor y las comparaciones entre los diferentes estudios sobre marcadores clásicos de etilismo y/o hepatopatía alcohólica.

4.2.3. Eficacia de los marcadores biológicos clásicos para diagnosticar hepatopatía alcohólica frente a hepatopatía no alcohólica (comparación de grupos 1 y 2):

Se ha valorado si existen diferencias entre los marcadores respecto a enfermedad hepática alcohólica (grupo 2) frente a pacientes abstemios con hepatopatía no alcohólica (grupo 1) reflejados en **Tabla 4.21**.

Marcadores biológicos	Grupos 1 y 2 (nº de individuos = 89) H. ALCOHOLICA			Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo (%)	
	Si*	No	Total			VP P	VP N
VCM							
Elevado	18	4	22	55	93	82	77
Normal	15	52	67				
Total	33	56	89				
GGT							
Elevado	23	25	48	70	55	48	75
Normal	10	31	41				
Total	33	56	89				
GOT							
Elevado	25	31	56	24	55	44	76
Normal	8	25	33				
Total	33	56	89				
GPT							
Elevado	19	37	56	57	34	34	57
Normal	14...	19	33				
Total	33	56	89				
Alguna alteración bioquímica							
SI	37	70	107	95	17	34	88
NO	2	14	16				
Total	39	84	123				

Tabla 4.21: Eficacia diagnóstica de las pruebas de laboratorio para identificar apacientes con hepatopatía de origen alcohólico.

Por lo que respecta a los marcadores de lesión hepática, se ha observado que la sensibilidad en la identificación de individuos bebedores es mayor para GGT (70%), sin embargo, en este grupo de pacientes con hepatopatías se detecta que son marcadores menos específicos ya que se han encontrado un porcentaje considerable de individuos no bebedores con niveles elevados de GOT, GPT y/o GGT. Entre los tres parámetros analizados se podría destacar la mayor sensibilidad y especificidad de la GGT con respecto a las transaminasas. Desde el punto de vista de los resultados relativos a los marcadores biológicos clásicos estudiados en el presente colectivo de individuos con hepatopatías, se ha observado que las enzimas hepáticas presentan una especificidad baja, esto es, un alto porcentaje de individuos no bebedores con hepatopatía de otro origen presentan también niveles elevados de actividad. Por otra parte, en este grupo de pacientes, el VCM sobre todo seguido de la GGT se presentan como los biomarcadores más útiles en cuanto a la identificación de bebedores y sobre todo de bebedores-hepatopatía alcohólica, sobre todo en cuanto a la especificidad (93% en VCM) y en su significación estadística (**Tabla 4.22, ambos $p < 0,001$**).

VARIABLES/ IGUALDAD DE VARIANZAS ASUMIDA (SI/NO)		TEST DE LEVENE PARA IGUALDAD DE VARIANZAS		T-TEST PARA IGUALDAD DE MEDIAS		
		F	SIG.	t	df	2-colas
EDAD	SI	5,939	,017	-2,043	87	,044
	NO			-2,219	83,351	,029
VCM	SI	9,518	,003	-4,490	87	,000
	NO			-3,843	41,910	,000
GOT	SI	3,208	,007	-2,451	87	,016
	NO			-2,273	52,988	,027
GPT	SI	,927	,338	,437	87	,664
	NO			,467	80,996	,642
GGT	SI	23,449	,000	-3,519	87	,001
	NO			-2,732	33,062	,010
P = SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA EN NEGRITA						

Tabla 4.22: Test independientes simples: comparación grupos 1 y 2.

En cualquier caso, se deben tomar precauciones en la interpretación de los resultados, ya que cuando se trata de parámetros hematológicos (como el VCM) es necesario tener en cuenta que al margen del consumo de etanol, los valores pueden verse alterados debido a otra serie de causas como en casos de alteraciones tiroideas, anemias, presencia de determinados fármacos, etc. Hay autores que además señalan un aumento de sus valores de forma lineal con la edad, también para la GGT (**Yersin B 1995, Sillanauke P 1998**).

Respecto a las enzimas de función hepática, cabe señalar que una alteración en sus niveles es síntoma de un mal funcionamiento hepático que puede estar provocado por diferentes causas. Se ha visto que en muchos casos en los que existe un consumo elevado de etanol no se produce un aumento simultáneo de niveles de actividad enzimática, de forma que muchos bebedores presentan niveles normales de GOT y GPT. Los resultados presentados sugieren la idea de que la alteración de los niveles de transaminasas en bebedores se produce en fases avanzadas de la enfermedad en las que ya existe el daño hepático. Igualmente, y tal y como sucede con el VCM, los niveles de transaminasas pueden verse alterados en otras muchas patologías como son el caso de pancreatitis, enfermedades de tipo muscular, algunos fármacos, etc.

4.2.4 Comparación de marcadores en grupos 2 y 3. Utilidad en diagnóstico y pronóstico en HAA:

Los resultados de comparar los diferentes marcadores clásicos, leucocitos y BR, entre los grupos 2 y 3 (pacientes con hepatopatía alcohólica sin HAA en biopsia, frente a hepatopatía alcohólica con HAA en biopsia hepática) reflejados en **Tabla 4.23** han revelado algunos datos interesantes:

Marcadores biológicos	Grupos 2 y 3 (n° de individuos = 64) HAA			Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo (%)	
	Si*	No	Total			VPP	VPN
VCM							
Elevado	25	18	43	81 %	45 %	58 %	71 %
Normal	6	15	21				
Total	31	33	64				
GGT							
Elevado	30	15	45	97 %	54 %	67 %	95 %
Normal	1	18	19				
Total	31	33	64				
GOT							
Elevado	30	25	55	97 %	24 %	54 %	89 %
Normal	1	8	9				
Total	31	33	64				
GPT							
Elevado	24	19	43	77 %	42 %	56 %	67 %
Normal	7	14	21				
Total	31	33	64				
Alguna alteración bioquímica							
SI	30	31	61	97 %	6 %	49 %	67 %
NO	1	2	3				
Total	95	33	64				

TABLA 4.23: Eficacia diagnóstica de las pruebas de laboratorio para la identificación de pacientes con HAA en pacientes con hepatopatía alcohólica definida histológicamente

-Los marcadores clásicos VCM, GGT y transaminasas han mostrado una escasa especificidad y VPP bajos, en función de la hepatopatía de fondo avanzada (mayoría de cirrosis) en ambos grupos, lo cual permite deducir que son poco eficaces en la detección precoz de HAA. En el estudio independiente, el marcador GOT es clínicamente relevante y estadísticamente significativo ($p < 0,001$), lo cual revela el daño hepático avanzado en caso de HAA, si bien la mayoría de los autores niegan la eficacia de la GOT como valor diagnóstico de HAA (**Chedid**

A 1991, Fujimoto M 1999, Kamath PS 2001) ni tampoco le conceden valor pronóstico.

- Un marcador que en el presente estudio se ha mostrado como muy eficaz en la **HAA es la leucocitosis** ($< 12.000/\text{mm}^3$ valor de referencia). Los valores medios que se han encontrado en el presente estudio son los siguientes: $6.785 \pm 2.058 /\text{mm}^3$ en grupo 1 o no bebedores, $7.657 \pm 3.003 /\text{mm}^3$ en grupo 2 y $13.522 \pm 6.203 /\text{mm}^3$ en grupo 3. Su eficacia se debe a su elevada especificidad (85%) y VPP (77 %) lo cual coincide con otros auto-

VARIABLES/ IGUALDAD DE VARIANZAS ASUMIDA (SI/NO)		TEST DE LEVENE PARA IGUALDAD DE VARIANZAS		T-TEST PARA IGUALDAD DE MEDIAS		
		F	SIG.	t	df	2-colas
EDAD	SI	,009	,926	1,045	62	,300
	NO			1,042	60,614	,301
VCM	SI	,025	,875	-3,352	62	,001
	NO			-3,354	61,859	,001
GOT	SI	,932	,338	-4,939	62	,000
	NO			-4,861	47,302	,000
GPT	SI	,000	,990	-,228	62	,820
	NO			-,227	57,500	,821
GGT	SI	,388	,536	-1,116	62	,269
	NO			-1,106	55,349	,274
LEUCOCITOS	SI	5,006	,029	-4,860	62	,000
	NO			-4,765	42,730	,000
BILIRRUBINA	SI	53,446	,000	-8,845	62	,000
	NO			-8,585	31,753	,000
SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA EN NEGRITA						

TABLA 4.24: Test independientes simples: Comparación grupos 2 y 3.

res, siendo significativa en los test independientes ($p < 0,001$) (Parés A 1978, Parés A 1986, Lindros KO 1995, Caballería J 1996, García Montes JM 1997). Sin embargo su utilidad como factor pronóstico o de mortalidad en el mes posterior a la HAA es nula lo cual ya ha sido señalado por otros autores (Sheth M 2002, Kamath PS 2001, Chedid A 1991, Menon KV 2001).

En segundo lugar se sitúa la BR (valor de referencia < 1.2 mg/dl). Los valores medios que se han encontrado en los tres grupos del estudio que se ha realizado son los siguientes: $0,9 \pm 0,8$ mg/dl en grupo 1, $2,2 \pm 1,8$ mg/dl en grupo 2 y $18,8 \pm 10,7$ en grupo 3, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,001$, Tabla 4.24), revelando la enorme elevación coincidiendo con HAA. Otros autores lo relacionan con el pronóstico de muerte de HAA a partir de la llamada Función Discriminante (Maddrey WC 1978, Mc Cullough AJ 1998, Forrest EH 2003) o de forma conjunta con ascitis con valores superiores a 8 mg/dl (Sheth M 2002). La especifi-

cidad en el presente estudio como marcador de HAA se eleva al 80% con valores superiores a 8 mg/dl coincidiendo con este autor (Sheth M 2002). Sin embargo tanto los leucocitos como la BR se elevan en multitud de situaciones patológicas y no pueden considerarse como buenos marcadores de estado o como factores predisponentes, puesto que son más una consecuencia de la propia HAA (Wallach J 2002).

Lo referido hasta el momento hace por lo tanto, muy conveniente, la introducción de marcadores biológicos que permitan estimar de una manera precoz, incluso preventiva, no tanto la predisposición de un individuo al abuso de alcohol, sino en todo lo referente a la susceptibilidad individual a desarrollar patologías derivadas directamente del consumo de alcohol.

4. 3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS ENZIMAS METABOLIZADORAS QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO DEL ALCOHOL

Los resultados obtenidos en el presente estudio, tanto desde un punto de vista bioquímico como genético, generan una serie de elementos de discusión acerca de la utilidad de ciertos marcadores y sobre el papel que desempeñan los polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizadoras del etanol en el desarrollo de HAA.

En cualquier caso, la relación entre un consumo elevado de etanol y el desarrollo de HAA es clara, de forma que la posibilidad de detectar de forma precoz una predisposición a desarrollar este tipo de patologías se presenta actualmente como una herramienta de gran utilidad en clínica. En este contexto, se ha planteado el estudio de polimorfismos genéticos en enzimas involucradas en la degradación y eliminación del etanol, su interés radi-

caría en la variabilidad en el metabolismo observada entre individuos. El estudio de polimorfismos genéticos de enzimas implicadas en el metabolismo del alcohol se presenta como un factor muy importante en el estudio de hepatopatías habida cuenta del tipo de información que pueden proporcionar acerca del recorrido que transcurre en el proceso de transformación del etanol en acetato, prestando especial atención al acetaldehído, su metabolito intermedio.

El alcoholismo es un conjunto heterogéneo de trastornos que comparten su relación con la ingesta de etanol. La importancia de los factores genéticos en el desarrollo del alcoholismo está avalada por una serie de investigaciones basados en estudios de familia, gemelos y adopción, que indican que los hijos de padres alcohólicos tienen un mayor riesgo para el desarrollo de alcoholismo **(Bierut LJ 1998)** calculándose valores de heredabilidad a la vulnerabilidad al alcohol entre el 40-60 % **(Hoenicka J 2003)**.

En el metabolismo del etanol intervienen principalmente los sistemas enzimáticos formados por la alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH), los cuales son los responsables de la oxidación de aproximadamente el 80 % del etanol. En un segundo plano se sitúa el sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS) catalizado por la familia 2E1 del citocromo P450 (CYP2E1), que interviene hasta en un 20 % del total del metabolismo alcohólico. En este sentido, es de señalar que de la regulación y concatenación de estos sistemas enzimáticos va a depender la velocidad de formación y eliminación de acetaldehído y por lo tanto su acumulación en hígado y sangre tras el consumo de alcohol. Se ha establecido que el tiempo de permanencia del alcohol en el organismo influye en la vulnerabilidad al alcoholismo, ya que

si alguna de las enzimas encargadas de la degradación del etanol presenta actividad más baja de lo normal a consecuencia de un polimorfismo genético, su eliminación será más lenta, lo que puede prolongar su actuación. Por lo tanto, la existencia de variaciones alélicas de genes implicados en el metabolismo del alcohol podría, al menos desde un punto de vista teórico, explicar la susceptibilidad individual al consumo excesivo de alcohol, a generar una conducta adictiva para el consumo, o la resistencia que presentan algunos pacientes a los tratamientos de deshabituación **(Hoenicka J 2003)**.

Diversos estudios epidemiológicos muestran la posible predisposición genética a la vulnerabilidad hacia el consumo de alcohol y sus enfermedades **(Yamauchi M 1995, Iwahashi K 1995, Wall TL 1999)**. Se ha relacionado mutaciones de ALDH2 con protección frente al alcoholismo, debido a que dicha mutación da lugar a la síntesis de una proteína inactiva, originando un retraso en la oxidación del acetaldehído y desencadenando una reacción molesta ante su ingesta quedando estos individuos protegidos frente al alcohol **(Li TK 2000)**. Diversos autores han negado la relación de ADH2 con el consumo de alcohol y enfermedades relacionadas **(Higuchi S 1995, Takeshita T 1996)**. Otros autores relacionan mutaciones de CYP11E1 con cáncer de páncreas, hepatocarcinoma y pancreatitis crónica en bebedores excesivos **(Yokoyama A 1999, Murata M 1999, Maruyama K 1999)**. La mayoría de los mismos se basa en el estudio de los polimorfismos de ALDH y ADH, siendo poco estudiados los correspondientes a CYP 450 y menos aún en población de origen caucásico **(Vidal F 1993, Carr LG 1995, Parsian A 1998, Reich T 1998, Whitfield JB 1998, Borrás E 2000, Loew M 2003)**.

En el presente estudio se han identificado las

siguientes mutaciones:

- Mutaciones **R47H** y **R369C** del **gen ADH2**.
- Mutación **E487K** del **gen ALDH2**.
- Mutacion correspondientes a los **alelos c1 y c2 del gen CYP11E1 (Rsa I)**.

En todos los casos se obtuvieron fragmentos de amplificación por PCR de aproximadamente 100 pb que se comprobaron mediante electroforesis sobre geles de agarosa al 2,5 % teñidos con bromuro de etidio.

En el análisis de la mutación R369 C del gen ADH2, tras el proceso de electroforesis capilar mediante SNP's en todas las muestras estudiadas se identifica un único pico de color azul que indica la presencia del gen normal en todas las muestras. Por lo que respecta a la mutación R47 H se observa un pico de color negro en los individuos sanos mientras que en los heterocigotos se observa un **pico de color negro y otro de color rojo**. El análisis de la mutación E487K de ALDH2 proporciona la visualización de un único pico de color azul en todas las muestras revelando la ausencia del gen mutado. Por último, en el análisis del gen CYP11E1, se observa la presencia de un único pico de color azul en todas las muestras analizadas en el caso de la región c1 (*Pst I*), lo que indica la inexistencia de la mutación, mientras que en el análisis de la región c2 (*Rsa I*) se observa la presencia de un **pico de color negro** en los individuos sanos mientras que en los heterocigotos se observa un pico de color negro y otro de color rojo (**FIGURA 4.1**).

Gen estudiado	Polimorfismo	Mutación analizada	Cambio de color observado
Alcohol Deshidrogenasa 2	ADH2*2	R47H (G ♦ A)	Negro ♦ Rojo
	ADH2*3	R369C (C ♦ T)	Azul ♦ Verde
Aldehido deshidrogenasa Mitocondrial	ALDH2*2	E487K (G ♦ A)	Azul ♦ Verde
Citocromo P450 2E1	CYP2E1 (c1)	Región 5' Zona <i>Pst</i> (G ♦ C)	Azul ♦ Negro
	CYP2E1 (c2)	Región 5' Zona <i>Rsa</i> (C ♦ T)	Negro ♦ Rojo

FIGURA 4.1: Relación de polimorfismos genéticos estudiados en el presente trabajo.

4.3.1. Determinación de frecuencias alélicas y genotípicas en los distintos grupos:

Los resultados obtenidos a partir del análisis genético de las mutaciones R47H y R369C de ADH2; E487K de ALDH2, c1 y c2 de CYP2E1 a partir de los grupos 1-3 definidos en los métodos han sido reflejados en la **Tabla 4.25 y 4.26**.

Además se han establecido las frecuencias respectivas de estas mutaciones en sangre en un grupo externo de validación o grupo 4. No se han encontrado individuos homocigotos para ninguna de las mutaciones analizadas. Por lo que respecta a las mutaciones R369C de ADH2 y E487K de ALDH2 no se ha detectado en ninguna de las muestras analizadas la presencia del alelo mutado, siendo todos los individuos normales para

	ADH2*1/ ADH2*1	ADH2*1/ ADH2*2	CYP2E1 c1/c1	CYP2E1 c1/c2
GRUPO 1	(43) 76%	(13) 23%	(52) 93 %	(4) 7 %
GRUPO 2	(30) 91%	(3) 9%	(28) 85%	(5) 15%
GRUPO 3	(27) 87%	(4) 13%	(17) 54%	(14) 45%
GRUPO 4 (**)	(63) 86 %	(10) 14 %	(68) 93%	(5) 7%
Significación estadística X2 pears on	NS	NS	NS	p< 0.001

Tabla 4.25: Distribución y frecuencias de genotipos de las mutaciones R47H (alelo ADH2*2) y R369C (alelo ADH2*3) del gen ADH2; E487K (alelo ALDH2*2) del gen ALDH2 y c1/c2 del gen de CYP2E1 en el colectivo estudiado de pacientes con diferentes tipos de hepatopatías.
**Determinación de mutaciones en sangre.

	ADH2*1	ADH2*2	CYP2E1 c1	CYP2E1 c2
GRUPO 1	88 %	12 %	96 %	4 %
GRUPO 2	95 %	5 %	92 %	8 %
GRUPO 3	93 %	7 %	77 %	23 %
GRUPO 4 (**)	93 %	7 %	96 %	4 %
Significación estadística X2 pears on	NS	NS	NS	p< 0.001

Tabla 4.26: Distribución y frecuencias de alélicas de las mutaciones R47H (alelo ADH2*2) y R369C (alelo ADH2*3) del gen ADH2; E487K (alelo ALDH2*2) del gen ALDH2 y c1/c2 del gen de CYP2E1 en el colectivo estudiado de pacientes con diferentes tipos de hepatopatías.
**Determinación de mutaciones en sangre.

estas mutaciones. **Estos resultados indican que los alelos ADH2*3 y ALDH2*2 no se encuentran en el colectivo analizado.** La mutación R47 H de ADH2 fue encontrada en 20 (25%) de los 120 individuos que se han analizado, proporcionando una frecuencia del alelo ADH2*2 de.12 %, 5 % y 7 % en los GRUPOS 1, 2 y 3 respectivamente. En el grupo de validación la frecuencia alélica que se ha encontrado de ADH 2*2 ha sido de 7 %. En lo referente a las mutaciones analizadas en el CYP2E1 se determinaron unas frecuencias de 4 %,8 %,23 %, 4 % para el alelo c2 en los GRUPOS 1, 2,3 y 4 respectivamente (**Tabla 4.26**). **De los resultados se ha destacado la alta frecuencia del alelo c2 en el grupo 3, siendo cinco veces superior a los gru-**

pos 1 y 4 o de población general no bebedora, y tres veces superior a la del grupo 2 o de hepatópatas sin HAA.

Con el fin de determinar la fuerza de asociación entre las diversas mutaciones y las diversas variables estudiadas con la HAA, se ha llevado a cabo un regresión logística con objeto de determinar las respectivas Odds Ratio (OR) (**Tabla 4.27, Tabla 4.28**) de las variables estudiadas, asimismo se han establecido las OR de las mutaciones excluyendo como variable al VHC, para evitar un posible sesgo. Las comparaciones referidas en el apartado de Métodos se han establecido entre los grupos 1 frente a 2 y sobre todo de 2 frente a 3 al ser grupos

Test	Value	df	Asymp.Sig (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig (1-sided)
Pearson chi-Square	1,465 (b)	1	,226		
Continuity Correction (a)	,717	1	,397		
Likelihood Ratio	1,412	1	,235		
Fisher's Exact Test				,283	,197
LINEAR-BY-LINEAR ASSOCIATION	1,449	1	,229		
N of Valid Cases	89 (grupos 1 (56)+ grupo 2 (33))				
(a) = Computed only for a 2x2 table			(b) = 1 cells (25 %) have expected count less than 5.The minimum expected count is 3,34		

Tabla 4.27: Análisis estadístico del polimorfismo c2 de CYP2E1 en grupos 1 y 2.

Test	Value	df	Asymp.Sig (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig (1-sided)
Pearson chi-Square	6,896 (b)	1	,009		
Continuity Correction (a)	5,534	1	,019		
Likelihood Ratio	7,093	1	,008		
Fisher's Exact Test				,013	,009
LINEAR-BY-LINEAR ASSOCIATION	4,61	1	,009		
N of Valid Cases	64 (grupos 2 (33)+ grupo 3 (31))				
(a) = Computed only for a 2x2 table			(b) = 0 cells (,0%) have expected count less than 5.The minimum expected count is 9,20		

Tabla 4.28: Análisis estadístico del polimorfismo c2 de CYP2E1 en grupos 2 y 3.

de las mismas características (consumo alcohol, hepatopatía alcohólica de base), todo ello para evitar sesgos.

Al analizar los grupos 2 y 3, se ha establecido que existe una fuerte asociación entre bebida y HAA (OR10,00), lo cual es evidente en cuanto causa-efecto. Asimismo entre mutación c2 y HAA (OR 4,62) en el análisis estadístico (Tablas 4.29 y 4.30).

VARIABLES	IC menor	OR	IC mayor
BEBEDOR EXCESIVO	2,16	10,00	52,69
SEXO	0,79	2,84	10,45
MUTACIÓN C2	1,24	4,62	18,05

Tabla 4.29: Análisis bivalente del polimorfismo c2 de CYP2E1 en grupos 2 y 3.

VARIABLES	IC menor	OR	IC mayor
BEBEDOR EXCESIVO	1,79	7,86	34,36
SEXO	0,65	2,60	10,39
MUTACIÓN C2	0,82	3,11	11,74

Tabla 4.30: Análisis de regresión logística del polimorfismo c2 de CYP2E1 en grupos 2 y 3.

Tras establecer las correcciones respecto a VHC mediante regresión logística la fuerza asociativa de mutación c2 y HAA sería de 3,11 (IC 0,82-11,7) (Tabla 4.30) También se ha establecido una OR de 2,60 (IC 0,65-10,39) algo más débil, entre sexo mujer y HAA (Tabla 4.30).

Se han establecido comparaciones entre las mutaciones analizadas en el presente estudio y los resultados de otros autores.

1º MUTACIONES DE ADH

La primera reacción en el metabolismo del etanol, la transformación de etanol en acetaldeído, constituye el paso limitante del proceso. Esta conversión está catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH).

En el presente trabajo se analizan los polimorfismos del gen ADH2 que originan los alelos ADH2*1 (tipo normal), ADH2*2 (mutación R47H) y ADH2*3 (R369C).

Desde un punto de vista bioquímico, estas mutaciones provocan serias modificaciones en las propiedades cinéticas de las enzimas. Por un lado afectan al pH óptimo de oxidación, modificándolo desde valores de 10,5 en el tipo normal hasta 7,0 en el tipo ADH2*3 (Xu Y 1988). La constante de afinidad del tipo normal por el coenzima NAD⁺ es inferior a 5 µM, mientras que la presencia de las mutaciones en los tipos mutados provocan variaciones en la K_m hasta en 70 veces entre las variantes (Hoog JO 1986, Hsu LC 1986, Xu Y 1988). También, estudios *in vitro* han puesto de manifiesto, que las tasas de oxidación de los genotipos ADH2*3/ADH2*3 son, entre 4 y 7 veces más altas que en el tipo normal, ADH2*1/ADH2*1 (Bosron WF 1986, Hoog JO 1986, Hsu LC 1986, Xu Y, 1988).

Diferentes estudios han revelado que el alelo normal, ADH2*1 es el más predominante entre la mayor parte de las poblaciones (Goedde HW 1992, Chen CC 1999) con frecuencias de aproximadamente un 90 %, mientras que el alelo ADH2*2 presenta una frecuencia extremadamente elevada en poblaciones orientales, hasta un 30 % (Muramatsu T 1995, Shen YC 1997, Chen CC 1999, Ericksson CJP 2001). En consonancia con los datos publicados de las propiedades cinéticas de este enzima, podría esbozarse que aquellos individuos con alelos mutados de ADH2, después de un consumo de alcohol, generarían acetaldeído más rápidamente que los portadores del alelo normal, y mostrarían por lo tanto una menor tolerancia al alcohol (Bosron WF 1986; Crabb DW 1989). Esta posibilidad no ha podido aún ser demostrada ya que no se han relacionado diferencias genéticas en

ADH2 con hábitos individuales en consumos de etanol. Hay autores que relacionan la baja prevalencia de ADH 2*2 con alcoholismo (**Thomasson HR 1994, Chao YC 1997**), mientras que en el otro lado otros autores relacionan alta actividad de ADH 2*2 con incremento del riesgo de daño hepático o de otros órganos (**Cozigou P 1990, Yamauchi M 1995**). Algunos estudios no han podido establecer criterios de asociación entre los diferentes genotipos de ADH2 y patrones de consumo de etanol (**Muramatsu T 1995, Higuchi S 1996, Takeshita T 1996**). En la misma línea, otros autores no detectan una prevalencia significativamente mayor de alelos mutados de ADH2 en pacientes alcohólicos con respecto a no alcohólicos (**Vidal F 1993**). Adicionalmente, tampoco se ha podido relacionar la presencia de alelos defectuosos de ADH2 con el desarrollo de enfermedades hepáticas (**Vidal F 1993**).

En el colectivo que se ha analizado no se han detectado individuos homocigotos para ninguna de las dos mutaciones estudiadas al tiempo que el alelo ADH2*3 no se ha detectado en ningún individuo de ninguno de los grupos en que fueron clasificados los pacientes. Estudios en población oriental indican la relación e influencia de los genotipos ADH 2*3 y el riesgo de alcoholdependencia (**Shibuya A 1988, Maezawa Y 1995, Xu Y 1988**). Otros autores señalan que no desempeñan un papel relevante en el desarrollo de hepatopatías alcohólicas y menos aún en población europea (**Panés J 1989, Poupon R 1992, Vidal F 1993**).

Por otro lado no se han encontrado diferencias significativas en el alelo ADH2*2 entre los dos grupos de bebedores, ni se ha hallado asociación entre mutación ADH2*2 y HAA (**P= 0,235**), tal y como se ha reflejado en la **Tabla 4.31**.

Test	Value	df	Asymp.Sig (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig (1-sided)
Pearson chi-Square	,238 (b)	1	,625		
Continuity Correction (a)	,008	1	,930		
Likelihood Ratio	,239	1	,625		
Fisher's Exact Test				,704	,464
LINEAR-BY-LINEAR ASSOCIATION	,235	1	,628		
N of Valid Cases	64 (grupos 2 (33)+ grupo 3 (31))				
(a) = Computed only for a 2x2 table		(b) = 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,39			

Tabla 4.31: Análisis estadístico del polimorfismo ADH2*2/*2 en grupos 2 y 3.

Adicionalmente, las frecuencias calculadas para este alelo han sido inferiores (5 % y 7 % grupos 2 y 3) en los grupos de bebedores respecto de la estimada en el grupo de pacientes no bebedores con hepatopatías diagnosticadas (12 % grupo 1), así como en el grupo 4 de comparación externa (7 %) en el estudio que se ha realizado. Estos resultados podrían permitir apoyar la hipótesis de que la presencia de este alelo puede ejercer un efecto protector frente al consumo de etanol, habida cuenta de las características catalíticas de esta variante, capaz de metabolizar el etanol a una velocidad mayor que el tipo normal. Esto podría provocar una acumulación excesiva de acetaldeído que provocara una menor tolerancia al alcohol.

Es necesario señalar que los diferentes estudios en el mundo occidental presentan diferencias sobre todo en cuanto a tres factores: estudio realizado en sangre o biopsia hepática (los menos), los estudios más antiguos valoran la actividad enzimática mediante electroforesis de ADH y ALDH pero no la mutación a nivel de ADN, si bien en principio estos aspectos no son relevantes. Adicionalmente se ha observado una enorme diversidad en cuanto a clasificación y definición de los grupos de pacientes estudiados, diferencias en cuanto a la definición de alcoholismo, ausencia de especificación de enfermedad hepática alcohólica a partir de histología, ausencia de concreción del grado histológico de hepatopatía, lo cual si podría ser clave a la hora de valorar la importancia de las mutaciones. Así se ha observado por ejemplo en los estudios iniciales de mutaciones de enzimas del metabolismo de etanol, como en el de **Panés J 1989** diferencias sobre todo en los criterios de inclusión de los pacientes, puesto que la cuantificación de consumo no se concreta, si bien si es similar en cuanto a los subgrupos histológicos que define, esto es: pacientes con biopsia normal, esteatosis, fibrosis, H. alcohólica, cirrosis alcohólica

y cirrosis más HAA. Adicionalmente al igual que en el presente estudio este autor realiza determinaciones de marcadores biológicos, BR, albúmina y Tiempo de protrombina. Como marcador biológico de Cirrosis destaca según este autor el T.de protrombina, si bien hay que señalar que los valores de BR son muy inferiores en los subgrupos de pacientes con enfermedad hepática alcohólica evolucionada como cirrosis con HAA (5,4 +/- 2,2 mg/dl) respecto a los del estudio que se ha realizado (18+/- 10 mg/dl en grupo 3 del presente estudio). Ello quizás podría deberse a menores consumos en esta serie (señala que los bebedores excesivos son los consumidores de más de 8 UBES/día pero no lo cuantifica por paciente ni especifica la media) y/o momento de recogida de dicho valor en el estudio de este autor. Es decir, el valor de la BR en el estudio presente corresponde al valor inmediatamente previo a la biopsia o sea en los primeros días tras el ingreso hospitalario, bien por descompensación de hepatopatía etílica, bien por HAA, sin embargo en el estudio de este autor posiblemente correspondan a valores más iniciales o más tardíos. Las frecuencias de mutaciones de ADH y ALDH descritas por este autor aparecen reflejadas en la **Tabla 4.32**.

ISOENZIMAS	ADH ATÍPICA		ALDH ATÍPICA	
	n	%	n	%
Número y %				
Normal o mínimos cambios	0/5	0	0/5	0
Esteatosis	0/9	0	1/8	12.5
Fibrosis	0/9	0	3/6	50
Hepatitis alcohólica	2/10	20	4/7	57.1
Cirrosis alcohólica	2/19	11.7	5/11	45.4
Cirrosis y hepatitis alcohólica	0/7	0	4/6	66.6
Total alcohólicos	4/60	6.6	17/43	39.5
Hepatitis crónica	1/14	7.1	1/13	7.6
Cirrosis NO alcohólica	1/10	10	1/8	12.5
Total no alcohólicos	2/24	8.3	2/21	9.5

Tabla 4.32: Distribución de isoenzimas alcohol dehidrogenasa y aldehído dehidrogenasa en enfermedad hepática alcohólica (Tomada de **Panés J 1989**).

La presencia de mutación ADH se relaciona según este autor con menor susceptibilidad al desarrollo de hepatopatía alcohólica crónica en virtud de las prevalencias encontradas (8.3 % en no alcohólicos con diversos grados de hepatopatía virus C o no alcohólica frente a 6.6% en alcohólicos con diversos grados de hepatopatías). En el presente estudio caso las prevalencias son algo mayores (12% en no alcohólicos con diversas hepatopatías, 5% en hepatopatía alcohólica sin cirrosis y 7 % en hepatopatía alcohólica con HAA y 7 % en el grupo externo. Sin embargo analizando el estudio de **Panés J** llama la atención los elevados porcentajes de mutaciones de ADH2 en los subgrupos de pacientes con cirrosis (11%) y de cirrosis con HAA (20 %) que ven reducidos su porcentaje al hacer la media global (quedando en lo señalado de 6.6%). Sin embargo es difícil inferir conclusiones dado que el número de pacientes de estos dos grupos es reducido (19 cirróticos sin HAA y 7 cirróticos con HAA), pero el elevado porcentaje de ADH atípica contrasta con las propias conclusiones del estudio y con los resultados del presente estudio en pacientes con hepatopatía con o sin HAA. La mayoría de los autores que comenzaron a estudiar las mutaciones de ADH coincidían en señalar la ausencia de relación de ADH atípica con alcoholismo y/o enfermedad hepática alcohólica o cirrosis en la población occidental como **Nuutinen HU 1986, Shibuya A 1988, Day CP 1991, salvo excepciones como Cozigou P 1991.**

Cuando se comparan los resultados obtenidos con los de otros estudios europeos más recientes se observan respecto a las mutaciones de ADH semejanzas y diferencias, estas últimas sobre todo en cuanto a criterios de clasificación de los pacientes y definición de consumo de alcohol, o bien porque

el termino hepatopatía alcohólica incluye a pacientes en diferentes estadios cirrosis, esteatosis... no empleando el criterio histológico que se ha considerado clave en el presente estudio. Así, **Poupon R 1992** estudia la actividad enzimática de las enzimas ADH y ALDH y sus correspondientes mutaciones en 161 pacientes, a los que se realiza **biopsias hepáticas**. Las principales diferencias con el presente estudio radican en los criterios de inclusión de los pacientes, así clasifica a los pacientes en 4 grupos:

- Bebedores de menos de 4 UBES/ día a los que se les realizó biopsia con motivo de una intervención quirúrgica. La información sobre los consumos se obtuvo a partir de cuestionarios. La biopsia hepática era normal o con mínimos cambios y no presentaban signos clínicos o en análisis de insuficiencia hepatocelular. Todos presentaban Ag HBs negativo, si bien no especifica virus C. Equivaldría a abstemios y bebedores ligeros sin hepatopatía. Bebedores excesivos con mínima hepatopatía (esteatosis) o sin ella y virus B negativo. Consideraba bebedores excesivos los varones con consumo superior a 12 UBES /día o mujeres con consumo superior a 7 UBES/día al menos durante diez años. Equivaldría a bebedores excesivos sin hepatopatía etílica.

Pacientes con cirrosis de origen viral no etílica, siendo este grupo equivalente al grupo 1 del presente estudio.- Pacientes con cirrosis sin virus B, equivaldría al grupo 2 con la salvedad de no especificar virus C y de ser virus B negativos.

Las características generales de esta serie aparecen en la **Tabla 4.33 y 4.34..**

CARACTERÍSTICAS	CIRROSIS ALCOHOLICA (n = 23)	CIRROSIS NO ALCOHOLICA (n = 18)	BEBEDORES EXCESIVOS (n = 58) SIN ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA	BEBEDORES MODERADOS (n = 42) SIN ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA
VARONES (%)	20 (90%)	11 (63 %)	44 (76 %)	14 (33 %)
EDAD	48+/- 7	56+/- 14	42+/- 7	52+/- 17
GOT	1.6+/- 1.4	4.3+/- 3.5	1.3+/- 1.3	1.1+/- 1.4
GPT	2.5+/- 2.8	3.6+/- 2.9	1.7+/- 1.7	0.9+/- 0.9
GGT	10.9+/- 8.1	4.1+/- 4.1	5.1+/- 6.0	1.9+/- 2.9
BR (umol/l)	35+/- 29	19+/- 14	19+/- 33	13+/- 10
PROTROMBINA (%)	71+/- 19	80+/- 10	95+/- 9	89+/- 13
VCM (fl)	103+/- 5	95+/- 7	102+/- 7	89+/- 7
CONSUMO ALCOHOL (UBES/día)	> 13	3+/-4	> 13	1+/- 1

TABLA 4.33: Características generales de diferentes grupos de pacientes según consumo. (Tomada de **Poupon R 1992**).

ADH	Cirrosis alcohólica (n= 23)	Cirrosis no alcohólica (n= 18)	Bebedores excesivos sin hepatopatía (n = 58)	Bebedores moderados sin hepatopatía (n = 42)
ADH 2*1/^{*1}	23 (100%)	18 (100%)	58 (100%)	41 (98 %)
ADH 2*1/^{*2}	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2 %)

Tabla 4.34: Distribución y frecuencias de genotipos de la mutación R47H (alelo ADH2*2) en pacientes con diferentes tipos de consumo y hepatopatía. (Tomado de **Poupon R 1992**).

Las prevalencias de mutaciones ADH 2 eran inferiores al 2% en todos los grupos como queda

reflejado en la **Tabla 4.34**

PACIENTES / ESTUDIO PRESENTE	NUMERO	ADH 2*1/*1 (%)	ADH 2*1/*2 (%)
NORMAL/ GRUPO 4	61/72	77/ 86	23/ 14
ALCOHOLICOS /GRUPO 2	60/33	93/ 91	7/ 9
NO-ALCOHOLICOS /GRUPO 1	24/56	91/ 76	9/ 23
P = 0,024			

TABLA 4.35 Frecuencias fenotípicas de ADH2 en sujetos normales y en alcohólicos y no alcohólicos con enfermedad hepática. (Tomado de Parés X, 1994)

Este autor no encuentra asociación entre ADH2*2 y cirrosis hepática. Además los pacientes con cirrosis tenían menor actividad de ADH que los pacientes sin cirrosis etílica y que los pacientes bebedores excesivos sin hepatopatía. La actividad de la ADH y ALDH eran menores por la mayor inducción del sistema MEOS según este autor. En el presente estudio no se ha determinado actividad enzimática al estar fijadas las muestras, si bien lo descrito para el Sistema MEOS explicaría una mayor tasa transcripcional en los pacientes con mutación c2 del presente estudio, pudiendo relacionar los resultados de **Poupon R 1992** con los descritos en el presente estudio. Esta autor al igual que en el presente estudio no encuentra relación entre mutaciones de ADH2 y hepatopatía alcohólica, así en el presente estudio la frecuencia de genotipo ADH 2*1/*2 ha sido del 9 % en hepatopatía alcohólica y del 13 % en HAA, siendo del 23 % en pacientes con hepatopatía de origen no etílico o grupo 1 y del 14 % en el grupo de comparación externa de donantes de sangre sanos (**Tabla 4.25**). Estudios similares encuentran prevalencias muy bajas de mutaciones ADH en población europea en torno al 2-5 % (**Ricciardi BR 1983, Bosron WF 1986, Nuutilinen HU 1986**). También en población Española como lleva a cabo **Parés X 1994** quién analiza la presencia de mutaciones en ADH2 y ADH3 a partir del análisis de biopsias hepáticas procedentes de 61

pacientes no alcohólicos (histología hepática normal, considerándolos controles, equivaldría a nuestro grupo 4) frente a 60 alcohólicos con enfermedad hepática crónica (casos) y 24 pacientes con enfermedad hepática no alcohólica (casos), siendo los casos equivalentes respectivamente al grupo 2 y 1 del presente estudio. Los resultados comparados con los del presente estudio se muestran en la **Tabla 4.35**.

Parés X 1994 no encuentra diferencias significativas en las frecuencias de fenotipos de ADH2 entre los grupos considerados ($P=0.024$), siendo sus resultados en mutaciones ADH2 similares a los del presente estudio como se ha reflejado en la **Tabla 4.35**, salvo en el caso de los pacientes del grupo no alcohólico frente a grupo 1 donde encuentra una menor prevalencia del genotipo ADH2*1/*2, quizás por el menor número de pacientes de este grupo en esta serie frente al presente estudio. Al igual que en el presente estudio no encuentra pacientes con la mutación ADH 2*3 de lo cual se deduce la baja o inexistente prevalencia de la misma en población Española. La prevalencia de ADH 2*1/2*2 en población no alcohólica sin hepatopatía es más alta en el presente estudio y de lo referido en la literaturas (23 % en presente estudio grupo 1 y 14% grupo 4 frente a 9% en **Parés X 1994**, 9 % en **Bosron WF 1986**, 1% **Poupon R 1992**).

Otro autor como **Gilder FJ 1993** estudia los polimorfismos de ADH y ALDH en ADN de muestras de sangre de 116 pacientes, dividiéndolos en alcohólicos o no, si bien se diferencia del presente estudio en cuanto a que no concreta cuantía de consumo, pero sobre todo en cuanto a la presencia o no de enfermedad hepática alcohólica entre los bebedores. Adicionalmente podría haber sido interesante que hubiese determinado valores de los marcadores biológicos en esta serie. Este autor no encuentra relación de mutaciones de ADH ni de ALDH con alcoholismo. Las frecuencias encontradas de los alelos son similares a las del presente para ALDH (sólo homocigotos), y algo menores para ADH2*1*2 en no alcohólicos (4%)

vs 12 % en grupo 1 del presente estudio y alcohólicos (4 %) vs 5% en nuestro grupo 2 del presente estudio. Otro estudio en población Española es el realizado por **Vidal F 1993** que valora la mutación ADH 2, en 222 pacientes cuyos criterios de definición se basa en el consumo de alcohol determinado mediante test, marcadores biológicos clásicos, historia clínica, asimismo diferencia subgrupos en función de los hallazgos histológicos, siendo la biopsia normal en los denominados controles. Este autor en el grupo de alcohólicos incluye a pacientes con un largo historial de consumo y cuantía del mismo superior a 10 UBES/día. La clasificación y resultados de este autor quedan reflejados en la **Tabla 4.36**.

	SUBGRUPOS	ADH ATÍPICA (Nº)	ADH ATÍPICA (%)
ALCOHOLICOS	CONTROLES (G1)	3/27	11.1
	ESTEATOSIS ALCOHÓLICA (G2)	5/29	17.2
	HEPATITIS ALCOHÓLICA (G2)	4/24	16.7
	CIRROSIS (G3)	4/27	14.8
	TOTAL ALCOHOLICOS (G1+ G2 + G3)	16/107	14.9
NO ALCOHOLICOS	CONTROLES (G4)	6/33	18.2
	ESTEATOSIS NO ALCOHÓLICA (G5)	2/12	16.7
	HEPATITIS CRONICA PERSISTENTE (G5)	2/24	8.3
	HEPATITIS CRONICA ACTIVA (G5)	4/23	17.4
	CIRRHOSIS NO ALCOHÓLICA	6/23	26.1
	TOTAL NO ALCOHOLICOS (G5+ G6)	6	17.4
TOTAL SERIES		36/222	16.2

TABLA 4.36: Prevalencia de ADH atípica en los grupos y subgrupos definidos. (Tomado de Vidal F, 1993).

Las principales diferencias con el presente estudio se basan en los criterios de inclusión, ya que en los alcohólicos incluye al realizar las frecuencias totales a diferentes subgrupos de diferentes características histológicas (esteatosis, hepatitis alcohólica y cirróticos. Adicionalmente no concreta la hepatopatía de los pacientes no alcohólicos salvo los casos de cirrosis no alcohólica que según el autor son “criptogenéticas” y postnecróticas en su mayoría, sin especificar virus de hepatitis B y/o C, siendo conocido que la mayoría de las cirrosis denominadas criptogenéticas son tras infección viral, si bien no se ha considerado como relevante por este autor. Los resultados de **VIDAL F (Tabla 4.36)** no muestran diferencias en ADH 2*1/*2 entre pacientes alcohólicos y no alcohólicos (14.9 % vs 17.4 %). Si bien, de la elevada prevalencia de ADH2*1/*2 en cirrosis no alcohólica (26 %) podría incluso inferirse un papel protector frente al alcoholismo y enfermedad hepática alcohólica tal y como sugieren otros autores (**Panés J 1989**). También podría ser interesante señalar que al analizar la serie se han encontrado diferencias entre los subgrupos en varones (81 % en cirrosis alcohólica) y mujeres (61 % en cirrosis no alcohólica), lo cual podría sugerir diferencias y explicar la alta prevalencia de ADH2*1/*2 en cirrosis no alcohólicas. Estudios posteriores como los de **Whitfield JB 1998** señalan la ausencia de relación entre mutación ADH 2*1/*2 y alcoholdependencia. Este autor realiza un estudio de determinación de genotipo de ADH en población australiana de origen europeo, determinando dichas mutaciones en hermanos gemelos de ambos sexos (159 varones y 176 mujeres). Lleva a cabo un seguimiento de los mismos en dos fases (1ª fase en años 1979-1981) de dos décadas distintas (2ª en años 1990-1992). Este autor determina el consumo de alcohol mediante cuestionario completado con CAGE, y clasifica a los pacientes en alcohol-dependientes y no alcoholdependien-

tes. Un aspecto interesante de este estudio lo representa la recopilación de datos de los ascendientes en 203 pacientes, dividiéndolos en tres categorías según procedencia: origen norte-europeo (R. Unido, Irlanda, Alemania, Países Bajos, Escandinavia, la propia Australia), sur-europeo (Países mediterráneos, Turquía y Líbano), origen asiático. Se ha de destacar en los resultados que no encontraron homocigotos para el alelo ADH 2*2, al igual que en el estudio que se ha realizado. El genotipo ADH 2*1/*2 en varones era del 12.2 % frente a tan sólo 5.7% en mujeres. Además la prevalencia de ADH2*1/*1 en varones era del 26% en el total de varones frente al 5.3% de varones con ADH 2*1/*2 y alcoholdependencia. En los ascendientes había un claro predominio del alelo ADH 2*2 en la población con al menos un abuelo de origen no no-europeo (12.5%) frente a aquellos con ascendientes de origen nor-europeo (1.9%). Concluye que los estudios en población sur-europea son con escaso número de pacientes y de ahí la posible infravaloración del efecto protector del alelo ADH 2*2 frente al alcohol y enfermedades relacionadas, y frente a la influencia del alelo ADH 2*1 en el consumo, alcoholdependencia y enfermedades relacionadas en varones, según sugiere este autor. En el presente estudio se ha observado una mayor prevalencia del genotipo ADH 2*1/*2 (23%) en el grupo de no bebedores (grupo 1) frente a los bebedores con enfermedad hepática y HAA (9% y 13 %) pero sin llegar a ser significativo, si bien, aunque es una conjetura, podría indicar una tendencia a la protección frente al alcohol tal y como describe este autor. Si bien, también es cierto que al compararlo con el grupo externo, la frecuencia del genotipo encontrada en el mismo, del 14 %, es similar a la del grupo 3, lo cual no apoyaría lo sugerido anteriormente, e indicaría que no hay relación del mismo en la protección al alcohol, y podrían no beber por otros motivos. Estudios más recientes en

la literatura como el de **Borrás E 2000** no encuentra diferencias entre las poblaciones de diversos países respecto a la presencia de los alelos ADH 2*1 y ADH 2*2. Este autor realiza un estudio multicéntrico con población procedente de varios países: España, Francia, Alemania, Suecia y Polonia. Establece una clasificación de pacientes en 4 grupos de acuerdo con su consumo de alcohol y grado de hepatopatía. Considera como alcohólicos (n=425) a los varones con consumos durante más de diez años superior a 10 UBES/día, a las mujeres con consumo mayor de 8 UBES/día. Todos eran pacientes hospitalizados por problemas relacionados con el alcoholismo o para deshabituación. Se valora el consumo a partir de la historia clínica y test de CAGE al igual que en el estudio que se ha realizado. A diferencia del presente estudio en el grupo de alcohólicos de **Borrás E 2000** había pacientes con cirrosis y otros sin enfermedad hepática alcohólica. Los sujetos no alcohólicos (n=451) eran aquellos con consumo nulo o inferior a 5 UBES/día en varones o 2 UBES/día en mujeres, esta es otra diferencia con el presente estudio

donde se ha excluido a los consumos entre 1-3 UBES/día. La mayoría de los no alcohólicos presentaban hepatopatía de origen viral. A la mayoría de los pacientes de este autor se les realizó biopsia hepática (excepto a 67 del total). Los alcohólicos sin enfermedad hepática presentaban biopsia normal o con mínimos cambios histológicos. En el grupo de pacientes con cirrosis hepática de **Borrás E2000** se excluyó a los que tenían serología positiva para virus B y/o C, lo cual lo diferencia de la presente serie. Se podría considerar, sin restarle importancia a los resultados de este autor, que esta exclusión podría ser un factor de sesgo a tener en cuenta, habida cuenta de lo referido en la literatura donde un porcentaje elevado de los mismos presentan VHC positivo, que además constituye un factor adicional en el progreso de la enfermedad hepática alcohólica y de la HAA (**García-Montes JM 1997, Cooksley W 1996, Alan S 1996, Herrera A 2000**). La determinación de genotipos se llevó a cabo en sangre mediante métodos de PCR en ADN de leucocitos. Los resultados se reflejan en la **Tabla 4.37:**

Grupo	n	Alelo *1 (%)	Alelo *2 (%)
Controles	224	97,8	2,2
Cirrosis Viral	199	96,2	3,8 (1) (2)
Alcohólicos sin enfermedad hepática	231	98,9	1,1 (1)
Alcohólicos con cirrosis	180	98,6	1,4 (2)
(1) P = 0,009 cirrosis viral vs. alcohólicos sin enfermedad hepática			
(2) P = 0,03 cirrosis viral vs. alcohólicos con cirrosis			

Tabla 4.37: Frecuencias alelicas de ADH en pacientes con diferentes tipos de hepatopatías. (Tomado de Borrás E, 2000)

La frecuencia del alelo ADH 2*2 era de media un 2.2 %, con un máximo en la población española de 5.4 % y mínimo en la francesa del 0 %, sin encontrar diferencias entre las poblaciones de diversos países. Con respecto a los alelos ADH 2*1 y ADH 2*2, observa una menor prevalencia de ADH 2*2 en los alcohólicos con o sin cirrosis, con diferencia significativa cuando se los compara con los pacientes no alcohólicos con cirrosis viral (**Tabla 4.37**). En el presente estudio no se han encontrado diferencias significativas entre los pacientes de los grupos 2 y 3 o con hepatopatía etílica frente a los del grupo 1 con hepatopatía de otro origen, aunque si una mayor prevalencia de ADH 2*2 entre los no bebedores (**Tablas 4.25 y 4.26**). Estos resultados coinciden con estudios en población oriental (**Thomasson HR 1991, Shen YC 1997, Chen CC 1999**). **Borrás E** afirma que sus resultados suponen apoyar de manera fuerte la hipótesis de que el alelo ADH 2*2 es un factor protector frente al alcoholismo. Sin embargo esto iría en contra de la fisiopatología del metabolismo del alcohol, ya que la rápida acumulación de acetaldehído daría lugar a un mayor daño del hígado. Este autor niega esta posible relación, en contra de otros estudios en población oriental (**Yamauchi M 1995**). La hipótesis de un posible aumento del metabolismo extrahepático en los portadores de ADH 2*2 no ha podido ser demostrada. **Borrás E** concluye que la prevalencia de ADH 2*2 en europeos es baja, en torno al 2% coincidiendo con otros autores anteriores (**Goedde HW 1992**).

Respecto al papel de los polimorfismo de ADH2 y su comparación o relación con los marcadores clásicos recientemente **Loew M 2003** estudia la influencia de la mutación ADH2 en el consumo de alcohol-elevación GGT en población no hospitalaria alemana. En los métodos, señalar la elevada población estudiada (862 varones y 1.144 mujeres).

Las características de la serie en **Tabla 4.38**:

POBLACIÓN	MEDIA	SD
EDAD	43.2	15.7
SEXO	Nº	%
VARONES	736	4.3 %
MUJERES	927	55.7 %
CONSUMO DE ALCOHOL (UBES/día)	Nº	%
0	383	23 %
>0- <=5	282	17%
>5- <=10	345	20.7 %
>10- <=20	327	19.7 %
>20	326	19.6 %
GENOTIPO ADH2	Nº	%
ADH2*1/*1 (Homocigoto)	1.616	97.2 %
ADH 2*1/*2 (Heterocigoto)	45	2.7 %
ADH 2*2/*2 (Homocigoto)	2	0.1 %
GGT (U/l)	MEDIANA 11.2	RANGO INTERCUANTIL (8.2-17.8)
<= 20	Nº=1.334	80.2 %
>20	Nº = 329	19.8 %

Tabla 4.38: Características y resultados de la población analizada por Loew M, 2003. (Tomado de Loew M 2003).

Retomando los aspectos más interesantes sobre los polimorfismos de la ADH es necesario destacar sobre los trabajos publicados en población no oriental que la mayoría de los mismos se basan en el estudio de las consecuencias que se derivan de la presencia de la mutación R47H en el alelo ADH2*2. Por lo tanto, y en virtud de los resultados de prevalencias de la mutación aquí presentados, **parece interesante profundizar más en el conocimiento sobre los efectos de las mutaciones R 47H en el alelo ADH 2*2 y R369C en el alelo ADH2*3 y el papel metabólico que pueden desempeñar en los individuos homocigotos o heterocigotos en la cinética de oxidación de alcohol y por lo tanto en los casos en que existe una menor tolerancia al consumo de alcohol.**

2º MUTACIONES DE ALDH

La segunda reacción en la ruta principal del meta-

bolismo oxidativo del etanol está catalizada por la aldehído deshidrogenasa (ALDH). Aunque existen varias formas de esta familia de enzimas, la principal implicada en la oxidación del acetaldehído es la aldehído deshidrogenasa citosólica (ALDH1), que presenta una constante de afinidad por el acetaldehído de 33 μM , y sobre todo la aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH2) que presenta una gran afinidad por el sustrato ($K_m = 0,2 \mu\text{M}$). La ALDH2 presenta dos presentaciones posibles, ALDH 2*1 y ALDH2*2, o activa e inactiva respectivamente, que difieren en la presencia de una mutación en el aminoácido 487 de la proteína, con una sustitución de un residuo de ácido glutámico por uno de lisina (ALDH 2*2= E487K). Aunque los dos alelos se expresan codominantemente, determinados estudios familiares (**Crabb DW 1989**) han puesto de manifiesto que la expresión ALDH 2*2 es dominante sobre la ALDH2*1, sugiriendo que cuando los dos productos están presentes, las dos subunidades forman heterómeros que desde el punto de vista catalítico son inactivos (**Xiao Q 1995**).

En el presente trabajo se analiza el polimorfismo del gen ALDH2 que origina el alelo ALDH2*1 (tipo normal) y ALDH2*2 (mutación E487K).

La presencia de esta mutación en la proteína madura provoca alteraciones estructurales importantes que dan lugar a una elevadísima K_m por el coenzima NAD^+ y por lo tanto a una menor tasa de oxidación de acetaldehído (**Farres H 1994**). Este cambio en la constante de afinidad por el coenzima genera un enzima con una actividad prácticamente nula a las concentraciones de NAD^+ intracelulares (**Xiao Q 1995**).

Este hecho significa que desde un punto de vista clínico, constituye el principal factor genético que influye en los patrones de consumo de etanol, en el

sentido de que la presencia de esta mutación en el gen de ALDH2 provoca un retraso en la eliminación de acetaldehído originando los desagradables síntomas que hacen desistir de su abuso, dando lugar al denominado síndrome de sensibilidad al alcohol. Las prevalencias de este polimorfismo han sido profusamente estudiadas, revelando que su frecuencia es especialmente elevada en poblaciones orientales, donde se ha observado que en China o en Japón, aproximadamente el 50 % de los individuos son portadores de la mutación (**Goedde HW 1992, Crabb DW 1993, Nomura F 2000**). Por el contrario, en otras poblaciones su prevalencia es muy baja o inexistente (**Xiao Q 1995, Yokoyama A 1999**).

Desde un punto de vista fisiológico es necesario destacar el papel fundamental que desempeña la ALDH2 en el metabolismo del etanol, tanto en homocigosis como en heterocigosis, habida cuenta de que individuos homocigotos ALDH2*2/ALDH2*2 no pueden tomar más de 90 ml de etanol (**Sun F 1999**) debido a las dificultades que presentan a la hora de eliminar el acetaldehído generado. **En el presente colectivo analizado no se ha detectado la presencia de la mutación E487K del gen ALDH2 en ninguno de los individuos analizados, ni en heterocigosis ni en homocigosis.** Esto es coincidente con la literatura publicada al efecto, poniéndose de manifiesto la ausencia o escasez de esta mutación en poblaciones no orientales (**Poupon R 1992, Gilder F 1993, Wan YJ 1998, Panés J 1989**).

En este sentido, y en el colectivo estudiado de pacientes con hepatopatías, no existen diferencias de genotipos entre el grupo de no bebedores y los de bebedores (con o sin hepatopatías alcohólicas), con lo cual parece que la ALDH2 no ejerce ninguna influencia sobre el desarrollo de hepatopatías

alcohólicas. Esto está en consonancia con el hecho de que las mutaciones en este gen pueden ejercer su acción en una etapa anterior, es decir en el efecto protector, similar al que provoca el fármaco disulfirán, frente a un consumo (incluso moderado) de alcohol, consecuencia de la dificultad en la eliminación del acetaldehído generado tras un consumo de etanol. Se ha relacionado la presencia de ALDH 2*2 en alcohólicos con cánceres orofaríngeos, esofágicos, estómago, colon y pulmón en población oriental (**Yokoyama A 1998, Yokoyama A 1999, Murata M 1999**), pero no con hepatocarcinoma (**Takeshita T 2000**). Hay autores que han relacionado la presencia de ALDH2*2 con protección frente al alcoholismo en población oriental (**Takeshita T 1998, Peng GS 1999, Wall TL 2000**). Se ha relacionado ALDH 2*1 con Síndrome de Wernicke-Korsakoff en pacientes consumidores excesivos de alcohol, según **Matshushita S**, que realiza dicho estudio en 564 pacientes de los cuales 47 desarrollan Síndrome de Wernicke-Korsakoff con una prevalencia muy superior de ALDH 2*1 respecto a ALDH 2*2. También se ha relacionado ALDH 2*1 en población laboral oriental con problemas relacionados con el alcohol (laborales y enfermedad hepática alcohólica) con una prevalencia de dicho alelo del 18.4% entre los pacientes con consumo moderado o excesivo de alcohol, frente a los mismos con ALDH 2*2 (4.8%) (**Takeshita T- Maruyama S 1998**). Otros estudios en población laboral Tailandesa, niega relación entre polimorfismos de ALDH y enfermedades relacionadas con el alcohol, pero si profundizamos en el mismo la población estudiada presenta un consumo de alcohol leve o moderado (entre 1-6 UBES), no alto-excesivo, con lo cual las conclusiones no son comparables con el presente estudio (**Nanakorn S 1999**).

Respecto al valor de las mutaciones de ALDH como marcador de alcoholismo existen pocos estu-

dios que lo comparen con los marcadores clásicos. Entre ellos destaca el de **Nomura F 2000**. Este autor determina GGT, VCM y CDT y la mutación ALDH mediante PCR en 227 pacientes varones japoneses bebedores de más de 7 UBES/día, para tratar de relacionar las elevaciones de los marcadores clásicos y CDT con diferentes alelos de ALDH. En los resultados se relaciona GGT elevada en bebedores excesivos (media de 81+/-85 U/l con alelo ALDH 2*1, y elevaciones de VCM (media de 98.2+/- 5) con alelo ALDH 2*2, sin encontrar patrón genético específico para la CDT. Concluye que el genotipo ALDH debería considerarse en la interpretación de los resultados de los marcadores biológicos de etilismo. Sin embargo otros autores no encontraron diferencias en los marcadores biológicos de hepatopatía y las mutaciones de ALDH (**Takeshita T 2000**). Otro autor (**Antón RF 1998**), sugiere que la actividad de la GGT en bebedores moderados-excesivos está directamente relacionada con la intensidad de la ingesta más que con la frecuencia. El alelo ALDH 2*1 debe ser el responsable al menos en parte de la inducción de GGT en bebedores habituales. La elevación de VCM y su relación con ALDH 2*2 es difícil de explicar, la macrocitosis en estos pacientes podría ser provocada por otras causas como déficit de folato o a la propia hepatopatía.

3º MUTACIONES DE CYP2E1

El citocromo P 450 constituye una superfamilia enzimática involucrada en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles (A y D), y en el metabolismo de xenobióticos entre los que se encuentran etanol, diversas drogas, carcinógenos, pesticidas, alcaloides, etc (**Nebert DW 1987, Guengerich FP 1991, Porter TD 1991, Koop DR 1992**). El complejo del citocromo P 450 está altamente distribuido en animales, plantas, y existe en

la naturaleza desde antes de la división entre organismos eucariotas y procariotas (**Ladero JM 1998**). En 1964 se sugiere el nombre de Citocromo P 450 por Omura y Sato (**Omura S 1964**). Se han descrito 74 familias de las cuales 14 están presentes en mamíferos. Estas 14 familias comprenden a su vez 26 subfamilias, de las que 20 se han identificado en el genoma humano (**Nelson DR 1996**), siendo las familias 1, 2 y 3 las únicas que participan en el metabolismo de sustancias exógenas (**Ladero JM 1998**). En mamíferos se ha encontrado Citocromo P 450 en gran variedad de órganos, glándulas y tejidos, pero es sobre todo en garganta e hígado donde radican los principales estudios sobre polimorfismos. La familia 2 del Citocromo P 450 comprende al menos cinco subfamilias (**Nebert DW 1987**), en la subfamilia CYP2 E se encuentra una enzima con un papel importante en el metabolismo del etanol: CYP2E1. Esta enzima participa en otra vía del metabolismo del etanol, es el denominado sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) localizado en el retículo endoplasmático de las células (**Koop DR 1992**).

El papel del CYP2E1 en el metabolismo del etanol no es muy relevante en personas no bebedoras o con consumo leve de alcohol, debido en parte a que los valores de K_m de 8-10 μM muestran una baja afinidad por el sustrato y a que se estima que únicamente un 10- 20 % del etanol es metabolizado mediante el sistema MEOS (**Lasker JM 1987**, **Hoienicka J 2003**). Sin embargo, parece que su relevancia en el caso de un consumo crónico y/o elevado de alcohol se hace mucho mayor, habida cuenta de que el principal sistema implicado en la oxidación del etanol, la ADH, es un enzima fácilmente saturable (**Hayashi S 1991**, **Koop DR 1992**, **Tsutsumi M 1994**, **Hoienicka J 2003**).

En el presente estudio se lleva a cabo un análisis

de del gen CYP2E1 de citocromo P450 2E1 que dan lugar a los polimorfismos c1 (alelo normal) y **c2 (alelo mutado)**, y su papel como marcador biológico de HAA.

La principal característica que define a estas mutaciones es que, y a diferencia de las mutaciones determinadas en ADH y ALDH, los cambios de nucleótidos no provocan sustituciones de aminoácidos y por lo tanto el efecto que ejercen sobre la función biológica es diferente, ya que no se modifican las propiedades cinéticas de los enzimas, sino que el efecto se produce a un nivel transcripcional, es decir las mutaciones estudiadas están localizadas en la región del promotor y por lo tanto los efectos se van a notar a nivel de la cantidad de proteína sintetizada (**Hayashi S 1991**). En este sentido, y desde un punto de vista fisiológico, cabe destacar que el alelo c2 presenta una tasa de transcripción mayor que el c1 y por lo tanto un mayor nivel de actividad enzimática (**Hayashi S, 1991**), habiéndose descrito en individuos japoneses con genotipo c2/c2 una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedad hepática alcohólica (**Iwawashi K 1995**), aunque hay autores que niegan esta relación (**Kato S 1995**). También es importante destacar que se han descrito variaciones étnicas en las prevalencias del polimorfismo c2, así **Stephens EA 1994**, describe que las frecuencias alélicas del c2 son diferentes según el origen étnico: 0.28 en Taiwaneses, 0.01 en Afro-americanos, 0.04 en Europeo-americanos.

En el colectivo que se ha analizado no se han detectado individuos homocigotos para el genotipo c2/c2, únicamente se encontraron individuos normales desde el punto de vista del genotipo de CYP 2E1 (**c1/c1**) y heterocigotos (**c1/c2**). Los resultados obtenidos en **Tablas 4.25, 4.26, así como en Tablas 4.39,4.40,4.41. Los respectivos OR en**

Tablas 4.28, 4.29 y 4.30.

SUBGRUPOS	C1	C2
NO CIRRÓTICOS (n = 27)	23 (85 %)	4 (15 %)*
CIRRÓTICOS (n = 6)	5 (83 %)	1 (17 %)*
* NS (p>0,05) Test de Fisher		

Tabla 4.39: Frecuencias alelicas c2 en subgrupos del grupo 2.

SUBGRUPOS	C1	C2
NO CIRRÓTICOS CON HAA (n = 10)	3 (30 %)	7 (70 %)
CIRRÓTICOS CON HAA (n = 21)	14 (67 %)	7 (33 %)

Tabla 4.40: Frecuencias alelicas c2 en subgrupos del grupo 3.

SUBGRUPOS	C1	C2
NO CIRRÓTICOS (n = 37)	26 (70 %)	11 (30 %)*
CIRRÓTICOS (n = 27)	19 (70 %)	8 (30 %)*
* NS (p>0,05) Test de Fisher		

Tabla 4.41: Frecuencias alelicas c2 en pacientes cirróticos frente a no cirróticos de los grupos 2 y 3.

Los resultados obtenidos en el presente estudio de pacientes con hepatopatías revelan aspectos muy interesantes en cuanto a las prevalencias de los alelos en los diferentes grupos. Además se ha llevado a cabo un estudio paralelo mediante la determinación de esta mutación en un grupo de control externo (grupo 4). El grupo 4 se ha utilizado como forma de comparar y validar en población general sana los presentes resultados. Se ha podido establecer claramente una diferencia entre el grupo de no bebedores y de bebedores que no han desarrollado hepatopatías (grupos 1 y 2) con el grupo de pacientes bebedores con HAA (grupo 3). Se observa que el alelo c2 presenta una frecuencia muy baja en los grupos de abstemios y de bebedores con enfermedad hepática alcohólica sin HAA, donde únicamente un 4% y un 8%, respectivamente, de los individuos resultaron ser portadores del alelo c2. También en el grupo de control externo de población sana la frecuencia alélica c2 es baja (4%). Por el contrario, **en el grupo de pacientes bebedores con HAA se observa una frecuencia del alelo c2 del orden de entre 5 y 3 veces superior respecto de los grupos 1 y 2 respectivamente**, encontrándose que el 23% de los pacientes con HAA son portadores del alelo c2 (Tabla 4.26). En el estudio estadístico se ha encontrado **una OR de 3,11 en grupo 3 de la mutación c2 respecto a grupo 2, lo que se traduce en una fuerte asociación entre mutación c2 y HAA** (Tabla 4.30).

Estos resultados aquí obtenidos son coincidentes con estudios en población oriental y algunos en población no oriental, que establecen correspondencia entre el hecho de ser portador del alelo c2 de CYP2E1 y el riesgo aumentado a desarrollar hepatopatías alcohólicas, si bien en el presente estudio destaca la fuerte asociación con la HAA, no con enfermedad hepática alcohólica de forma global. Al hilo de esto, y relacionando los polimorfismos de

CYP2E1 con un consumo elevado de alcohol, se ha descrito que individuos japoneses con el genotipo c2/c2 de CYP2E1 presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades hepáticas alcohólicas (**Sun F 1999**). Estos autores encuentran una interacción entre los genotipos de ALDH2 y CYP2E1 con el consumo de alcohol (**Tsutsumi M 1994**). Así, se detecta una mayor proporción de individuos portadores del alelo c2 en individuos consumidores de etanol. Según estos autores, una persona con una elevada actividad del alelo c2 es capaz de metabolizar alcohol más rápidamente y generar mayor cantidad de acetaldehído, el cual será posteriormente metabolizado a acetato por intervención de la ALDH2 activa. Así, individuos portadores del alelo c2 de CYP2E1 y del genotipo normal de ALDH2 presentarán una mayor tolerancia al consumo de alcohol y por lo tanto al desarrollo de enfermedades hepáticas asociadas. Según esta explicación, en aquellos individuos bebedores y portadores del alelo c2 de CYP2E1 se puede producir una cantidad de acetaldehído superior a los portadores del alelo normal, debido a la mayor actividad enzimática del citocromo, que aunque será posteriormente transformada en acetato vía ALDH2, puede tener un papel relevante en el desarrollo de hepatopatías alcohólicas habida cuenta del tiempo que puede permanecer en hígado hasta que la ALDH2 es capaz de eliminarlo. Asimismo, este pequeño exceso de acetaldehído en hígado puede no ser suficiente para provocar el síndrome de sensibilidad al alcohol que ejerce ese efecto protector frente al consumo de etanol, al tiempo que puede favorecer la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades hepáticas.

Investigadores japoneses sugieren que el polimorfismo c2 está relacionado con el desarrollo de enfermedades hepáticas en las que está implicado el consumo excesivo de alcohol (**Tsutsumi M 1994**,

Yoshihara E 2000).

En población occidental, hay escasos estudios sobre el polimorfismo de CYP 2E1 y enfermedad hepática alcohólica, la mayoría se refieren a cirrosis hepática o hepatocarcinoma, siendo inexistentes los estudios sobre HAA (**Carr LG 1995**, **Parisian A 1998**). Cuando comparamos los resultados del presente estudio con los realizados en población occidental se han observado diferencias en cuanto a los criterios de inclusión, definición de los consumos y diferentes orígenes étnicos de la población estudiada. Así, **Pirmohamed M 1995**, lleva a cabo un estudio en población americana toda de raza blanca y origen anglosajón. Desde un punto de vista metodológico los criterios de inclusión de pacientes presentan ciertas semejanzas con el presente estudio ya que se ha seleccionado pacientes con enfermedad hepática alcohólica, frente a tres grupos de controles (alcohólicos sin enfermedad hepática, pacientes con hepatopatía no alcohólica, voluntarios sanos). Sin embargo, profundizando en el estudio se han observado algunas diferencias con el estudio que se ha realizado, ya que en el grupo de pacientes con hepatopatía alcohólica (n=95), la mayoría son varones (n=67), con consumo excesivo de alcohol (media superior a 19 UBES/día durante más de diez años), clasificándolos en cirróticos (n=58) y hepatitis alcohólica (n=37), en base a la clínica y test bioquímicos de función hepática, sin especificarse en este estudio estos resultados ni la realización o no de ecografía hepática. Sólo confirma el diagnóstico clínico con histología en 31 pacientes (33%), debido a que presentaban alteraciones severas de la coagulación o a negarse a la realización de biopsia, a pesar de que es conocido que el parámetro definitivo para el diagnóstico de los diversos grados de hepatopatía alcohólica crónica es el histológico. Este autor no especifica el número de pacientes de

cada subgrupo (cirrosis o hepatitis alcohólica) en el cual se confirmó el diagnóstico clínico, lo que podría haber modificado en cierta manera la clasificación final de estos pacientes. Este autor excluye a aquellos pacientes con serología positiva a virus C y B. En cuanto a los grupos control se han observado algunas diferencias: en el grupo de alcohólicos sin enfermedad hepática alcohólica (n=58, 49 varones al igual que en el estudio que se ha realizado), la presencia o no de hepatopatía alcohólica se lleva a cabo según la historia clínica de ausencia de complicaciones, sin realizar en ninguno biopsia hepática, además estos mismos autores afirman en la discusión que es posible que un porcentaje no conocido de estos pacientes podría presentar diversos grados de hepatopatía alcohólica crónica. En el grupo de pacientes con hepatopatía no etílica, (n= 47, 27 mujeres, 20 varones), si se lleva a cabo la realización de biopsia, siendo la única diferencia la inclusión de un elevado número de pacientes con hepatitis tóxica de origen medicamentoso (n=26). En cuanto a los resultados de este autor se ha de destacar que encuentra una frecuencia de alelo c2 del 10% en el grupo de pacientes con enfermedad hepática alcohólica, superior y estadísticamente significativa a la de los tres grupos controles, reflejado en **Tabla 4.42**.

Se comparan los resultados de este autor con las frecuencias alélicas del estudio que se ha realizado: Grupo 3-enfermedad hepática alcohólica de este autor (23% vs 10%) quizás explicable por la asociación descrita entre mutación c2 y HAA, siendo diferentes los grupos puesto que este autor incluye tanto a cirróticos como a pacientes con H.alcohólica. En las frecuencias alélicas de los controles:Grupo 2 – en alcohólicos “sin hepatopatía alcohólica” de este autor (7% vs 3,4%) (**Tabla 4.42**), si bien son difícilmente comparables por lo que se ha referido en los métodos. Se observa una

GRUPO	NUMERO	NUMERO DE ALELOS (FRECUENCIA)	
		C1	C2
HEPATOPATIA ALCOHOLICA	95	171 (0,90)	19 (0,10)
ALCOHOLICOS SIN HEPATOPATIA	58	112 (0,966)	4 (0,034)
NO-ALCOHOLICOS CON HEPATOPATIA	47	91 (0,968)	3 (0,032)
VOLUNTARIOS SANOS	100	197 (0,985)	3 (0,015)
TOTAL GRUPO CONTROL	205	400 (0,976)	10 (0,024)

Tabla 4.42: Frecuencias alélicas de polimorfismo Rsa I en pacientes con enfermedad hepática alcohólica y controles. (Tomado de Pirmohamed M, 1995).

frecuencia alélica similar en el Grupo 1 del estudio que se ha realizado respecto a los controles no alcohólicos con hepatopatía de otro origen de este autor (4% vs 3,2%), siendo sin embargo superior la frecuencia alélica del grupo externo de población general o grupo 4 que se ha encontrado en el estudio que se ha realizado respecto al equivalente de voluntarios sanos de este autor (7% vs 1,5%), lo cual podría deberse a las diferencias en cuanto a origen étnico de ambas poblaciones, y obliga a pensar en la necesidad de realizar estudios poblacionales más amplios. Otro autor que investiga las mutaciones c2 de CYP2E1 en población caucasica es **Carr LG 1995**. Este autor estudia la frecuencia alélica c2 de CYP2E1 en 124 pacientes de Estados Unidos, todos de origen caucasico. Es destacable que el origen étnico era de procedencia del Este de Europa. El estudio es similar al que se ha realizado en cuanto a la división de los grupos: 53 pacientes alcohólicos con enfermedad hepática alcohólica evolucionada con biopsia hepática (42 con cirrosis y 11 con Hepatitis alcohólica), 39 pacientes alcohólicos (procedencia de unidad de alcoholis-

mo) sin enfermedad hepática, 32 controles de población normal. Como diferencias más apreciables, no especifica consumo de alcohol, sólo señala que el consumo es superior a 19 UBES/día durante más de 20 años, tampoco especifica el consumo de alcohol en los controles. Los resultados en **Tabla 4.43**.

	FRECUENCIA DE GENOTIPOS			FRECUENCIA DE ALELOS	
	C1/C1	C1/C2	C2/C2	C1	C2
TOTAL = 124					
ALCOHÓLICOS CON HEPATOPATÍA (n=53)	0,92	0,06	0,02	0,95*	0,05
ALCOHÓLICOS SIN HEPATOPATÍA (n=39)	0,90	0,10	0,00	0,95	0,05
POBLACIÓN SANA (n= 32)	0,97	0,03	0,00	0,98	0,02

Tabla 4.43: Genotipos y frecuencias alélicas de la mutación c2. (Tomado de Carr LG, 1995).

Las frecuencias alélicas no presentaban diferencias significativas entre alcohólicos con hepatopatía o sin ella ($p < 0,05$, test de Fisher).

No encuentra diferencias en las frecuencias alélicas entre alcohólicos con enfermedad hepática o sin ella (0,05 en ambos) ni con la población normal (0,02). Esta autor afirma que no había diferencias significativas en la frecuencia del alelo c2 entre los pacientes con H.Alcohólica y cirrosis dentro de los alcohólicos con Enfermedad Hepática Alcohólica, pero no especifica estos datos para compararlos con el estudio que se ha realizado. En este sentido coincide el estudio que se ha realizado con el de este autor en cuanto a no encontrar diferencias significativas en cirrosis-asociación con c2 en los subgrupos de los grupos 2 (cirróticos 17 % vs no cirróticos 15 %) y grupo 3.

Sin embargo este aspecto es diferente a lo descrito por autores en población oriental donde encuen-

tran relación entre mutación c2 y enfermedad hepática alcohólica-cirrosis (**Tsutsumi M 1993**). **Enfatizar que en el estudio presente se ha hallado una fuerte asociación entre c2 y HAA, con una OR de 3,11 en la comparación estadística entre los grupos 2 y 3, no habiéndose descrito este aspecto en otros estudios, referidos todos ellos a pacientes con cirrosis (Agúndez J 1996, Parsian A 1998).**

En la literatura el único estudio en población española en relación al polimorfismo Rsa I del CYP 4502E1 es el de **Agúndez J 1996**. Ese autor difiere del presente estudio en la clasificación de los pacientes: compara 58 pacientes mayoritariamente varones (52 varones, 6 mujeres) diagnosticados de cirrosis alcohólica mediante ecografía e historia clínica. El consumo de alcohol era al menos de 9 UBES /día durante al menos 10 años con una media de 15 UBES/día. El grupo control lo formaban 137 voluntarios sanos (116 varones y 21 mujeres con edad media de 32+/-19.4 años) inferior respecto al grupo 1 del presente estudio (edad media 43+/-12 años). Destacamos que en algunos aspectos este estudio carece de una descripción más detallada de los casos y controles en cuanto a procedencia de los controles y consumo en los mismos. Adicionalmente el criterio para incluirlo como caso no fue el diagnóstico histológico de cirrosis, el cual sólo se realizó en **Agúndez J 1996** en siete pacientes. Si bien es cierto que el diagnóstico de cirrosis basado en la clínica y hallazgos ecográficos es un diagnóstico presuntivo en caso de que los pacientes presenten alteraciones de la coagulación que impida su diagnóstico histológico, este último es el parámetro definitivo (**Herrera A 1999**). Esta autor a diferencia del presente estudio excluye a los pacientes con virus C, sin que aclare los motivos de la misma, lo cual podría ser un factor de sesgo, como ya se ha explicado previamente. En

cuanto a los resultados este autor describe que no encuentra diferencias significativas en los genotipos/alelos c2 entre los cirróticos y los controles, reflejado en **Tabla 4.44**.

FRECUENCIAS DE GENOTIPOS DE CITOCROMO P450 2E1				FRECUENCIAS ALÉLICAS	
	C1 C1	C1 C2	C2 C2	C1	C2
ALCOHÓLICOS CIRRÓTICOS (n= 58)	0.96 (56)	0.03 (2)	0.0 (0)	0.98	0.02
CONTROLES SANOS (n= 137)	0.94 (130)	0.05 (7)	0.0 (0)	0.97	0.03
No diferencias significativas (Test de Fisher)					

Tabla 4.44: Genotipos y frecuencias alélicas de la mutación c2. Tomado de Ladero J 1996)

Aunque no se refieren a HAA, si comparamos los resultados del estudio que se ha realizado con los de este autor, la frecuencia de genotipos es diferente entre el grupo 2 del presente estudio con diversos grados de enfermedad hepática alcohólica y los cirróticos de esta serie (15% vs 3%). Se ha analizado en profundidad este trabajo y las diferencias con el mismo no son tantas como parece en cuanto a resultados. Así, si comparamos los resultados de este autor con los del los subgrupos (cirróticos frente a no cirróticos) de los grupos 2 y3 en el estudio que se ha realizado (**Tabla 4.39**) la frecuencia del alelo encontrada en cirróticos es de 17%, siendo por tanto más elevada que la descrita por este autor, pero al igual que este autor/es no se han encontrado diferencias significativas entre subgrupos del grupo 2 en el estudio que se ha realizado (17% cirróticos vs 15% no cirróticos, **Tabla 4.39**)

Lo mismo ocurre en el grupo 3 en cuanto a frecuencia alélica de c2 entre los cirróticos con HAA (33%), frente a la misma en no cirróticos con HAA (70%), se ha observado una mayor asociación incluso entre no cirróticos y HAA, si bien debido al

número de pacientes no se puede establecer una conclusión definitiva de este aspecto (**Tabla 4.40**). Asimismo se han agrupado los cirróticos de los grupos 2 y 3 frente a los no cirróticos para comprobar si existían diferencias en las frecuencias alélicas de c2 entre estos grupos de pacientes observando que en los resultados que la frecuencia alélica era la misma (30 % en ambos) como se ha reflejado en (**Tabla 4.41**). Estos resultados refuerzan la conclusión de la asociación entre alelo c2 y HAA, independientemente del estadio de enfermedad hepática alcohólica en que se encuentre el paciente. Por lo tanto aunque las frecuencias alélicas en cirróticos encontradas son mayores en el estudio realizado respecto a estos autores (17% en grupo 2 vs 1,7% en **Agúndez J**), tampoco se puede concluir en el estudio realizado que el polimorfismo c2 está asociado al desarrollo de cirrosis, coincidiendo con **Agúndez J 1998, Carr LG 1995, Lucas D 1996**, pero discrepando de otros estudios en población caucásica que si relacionan la mutación RsaI con cirrosis (**Pirmohamed M 1995, Wong NACS 2000**). Cuando se comparan los pacientes no bebedores (aunque con diferentes grados de hepatopatía no alcohólica, sobre todo por virus C), así como los controles externos del estudio que se ha realizado, en cuanto a frecuencias genotípicas c1/c1 y alélicas c1 con los de este autor se han encontrado similitudes en los resultados de frecuencias genotípicas c1/c1 (93% grupo 1, 93% grupo 4, 94% en **Agúndez J**) y frecuencias alélicas (96%, 96%, 97%) respectivamente, con lo que podemos deducir que la frecuencia del genotipo normal se sitúa alrededor del 94%, lo cual es concordante con lo descrito por otros autores en población caucásica (**Carr LG 1995, Pirmohamed M 1995, Parsian A 1998, Kato S 1995**). Es destacable, que tanto en el grupo 4 o de control externo como en el grupo 1 es ligeramente superior la frecuencia alélica c2 (4% controles externos, 4% en grupo 1) frente a lo des-

crito por otros autores en población europea y estadounidense de origen caucásico (población de origen en Europa del Este en **Parsian A 1998 y Carr LG 1995**); así la frecuencia es del 3 % en el estudio de **Agundez J 1996**, del 2 % en el de **Carr LG 1995**, lo cual debería dar lugar a estudios poblacionales más amplios y en distintas regiones para determinar una frecuencia alélica más aproximada y probablemente diferente según el origen étnico de cada población. Con respecto a otros autores los resultados son similares en cuanto a la ausencia de relación de cirrosis con polimorfismo c2. Así, **Parsian A 1998** investiga la presencia de polimorfismo de CYP2E1 en 174 pacientes alcohólicos, la mayoría varones, de origen Este-europeo. Clasifica a los pacientes en cirróticos (43 pacientes con biopsia hepática compatible) y no cirróticos (131 pacientes), 89 controles con igualdad de varones/mujeres. Esta autor señala que en los pacientes cirróticos no hay ninguno con HAA. Los controles son pacientes sin criterios de alcoholismo según este autor, pero no define consumo. Este autor no encuentra diferencias entre los diferentes grupos en cuanto a frecuencias alélicas c2 de su estudio, reflejado en **Tabla 4.45**.

GRUPO	c2	c1	NÚMERO DE PACIENTES
ALCOHÓLICOS CON CIRROSIS	0 (0,0)	86 (1,0)	43
ALCOHÓLICOS TIPO II	1 (0,005)	197 (0,99)	99
CONTROLES NORMALES	2 (0,012)	176 (0,98)	89

Tabla 4.45: Frecuencia de alelos RsaI en alcohólicos con cirrosis, alcohólicos tipo II y controles. (Tomado de Parsian A 1998)

Al hilo de lo comentado sobre las diferencias en frecuencias de mutación según el origen étnico, hay trabajos recientes en la literatura en poblaciones de origen hispano, como el de **Konishi T 2003**. Este autor realiza un amplio e interesante estudio determinado los polimorfismos de ADH, ALDH y CYP 2E. Clasifica a los pacientes en dos grupos: 101 varones alcohólicos de origen mejicano (hasta dos generaciones) con edad media (37+/-12 años) frente a 104 controles no alcohólicos procedentes de otros estudios (**Wan YJ 1998**), de origen hospitalario. El criterio de alcoholismo se basa en el consumo de más de 8UBES/día durante más de cinco años. Si bien hay algunas diferencias demográficas con el presente estudio, a saber, todos los pacientes de este autor son varones y la media de edad de los casos es inferior a la del grupo 3 del presente estudio (37,1 +/- 11,8 vs 46,1+/- 10,1 años). Los resultados de este autor quedan reflejados en la **Tabla 4.46**

POLIMORFISMOS		Nº (%) DE PACIENTES CON GENOTIPO			
		1/1	1/2	2/2	FRECUENCIA DE ALELOS (%)
ADH2	NO	96 (92.3)	7 (6.7)	1(1.0)	4.3
ADH2	ALCOHÓLICOS	96 (95.0)	4 (4.0)	1 (1.0)	3.0
ALDH2	NO	104 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
ALDH2	ALCOHÓLICOS	101 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
CYP2E1Rsa I	NO	81 (77.9)	22 (21.1)	1 (1.0)	11.5
CYP 2E1 Rsa I	ALCOHÓLICOS	66 (65.3)	34 (33.7)	1 (1.0)	17.8

Tabla 4.46: Frecuencia de genotipos y alelos en mejicano-americanos no alcohólicos y alcohólicos (Tomado de Konishi T 2003).

Este autor encuentra una frecuencia de **genotipo c1/c2 de 33.7 % en alcohólicos** frente a 21.1 % en no alcohólicos, **del alelo c2 17.8% en alcohóli-**

cos frente a 11.5 % en no alcohólicos (**Tabla 4.46**). En el estudio estadístico la relación alelo c2 y alcoholismo es significativa ($p < 0.01$), con una frecuencia dos veces mayor en alcohólicos respecto a no alcohólicos (en el estudio que se ha realizado hasta 5 veces mayor entre el grupo 3 y el 1, si bien la clasificación de los mismos es diferente en el presente estudio y en el de **Konishi T**. Son inferiores los datos de frecuencia y alelo c2 el grupo de no bebedores o grupo 1 (genotipo 7%, alelo 4 %) del presente estudio respecto a los no alcohólicos de este autor (21,1 %, 11,5 %). También son superiores las frecuencias de genotipo-alelos en alcohólicos (33.7%, 17.8 %) de este autor, frente a los resultados de los grupos 2 (genotipo 15 %, alelo 8 %), e inferiores cuando se comparan con las frecuencias del grupo 3 del presente estudio (genotipo 45 %, alelo 23 %), en situación ambos de consumo de alcohol excesivo. Una posible explicación de estas diferencias radicaría en el género, siendo todos varones en el estudio de este autor Hay que señalar que **Konishi T** no señala la presencia o no de enfermedad hepática alcohólica entre los pacientes alcohólicos. Sus resultados en cuanto a mutaciones ADH y ALDH son coincidentes con los del presente estudio. Los resultados de este autor son coincidentes con los realizados en población americana de origen mejicano por **Wan YJ 1998**, que encuentra una relación entre enfermedad hepática alcohólica y c2 con una frecuencia alélica en esta población del 16 %. Otro aspecto interesante referido por **Konishi T** es la mayor prevalencia del alelo c2 en bebedores excesivos cuya edad es inferior a 25 años frente a los mayores de 25 años (22,1 % vs 17,1 %). En cualquier caso hay coincidencia en cuanto a la relación entre genotipo c1-c2 y enfermedad hepática alcohólica, las diferencias pueden venir motivadas por la mayor prevalencia de dicho genotipo en población de origen mejicana, en torno a 16 % según **Wan YJ 1998**,

habiéndose descrito también porcentajes similares en población hispana de origen nicaragüense y población mejicana-americana (**Martínez C 1998, Wan YJ 1998**). Estos autores encuentran una frecuencia de dicho genotipo en no alcohólicos intermedia (11.5 %) entre la encontrada en población Asiática (22.9%) y occidental (1-11 %), lo cual no viene sino a ser el reflejo del mestizaje en sus orígenes de dicha población hispana (**Stephens EA 1994**), donde se estima que el 31 % son americanos nativos, el 61 % origen español y el 8 % africano (**Hanis CL 1991**), siendo similar la frecuencia genotipo c1/c2 en nuestro grupo 1 (7%) y en el control de validez externo (7%). Por tanto se podría concluir que es posible que la mutación c2 sea más prevalente en la población de origen hispano que en otras razas caucasoides.

Otros aspectos importantes a destacar en la literatura respecto a la mutación RsaI (alelo c2) del CYP2 E1 es su relación con neoplasias. Así **Ladero J 1996** encuentra una mayor probabilidad de hepatocarcinoma celular en población caucásica consumidores excesivos de alcohol cuando poseen una copia de c2, al igual que otros autores que estudian población caucasoide como **Wong NACS 2000**. Sin embargo otros autores no relacionan dicha mutación con cáncer como **Lucas D 1996** que no encuentra relación con cáncer esofágico o de estómago en población Francesa, o incluso le confieren un aspecto protector frente a cáncer de pulmón en población Finlandesa (**Hirvonen A 1993**). Otros aspectos interesantes de esta mutación se refieren al posible reflejo de la misma en determinadas características sociales y derivadas de la alcohol-dependencia dentro de los alcohólicos. Así, **Nakamura K 2003** compara en dos grupos de alcohólicos (total 52), 19 con c1/c2 o c2/c2 y otro grupo de 33 pacientes con c1/c1 determinadas características sociosanitarias de los mismos:

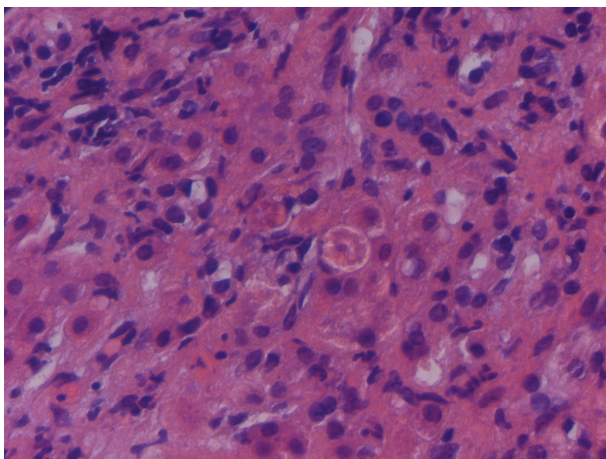


Figura 4.2. HAA con cuerpo de councilman y hepatocitos con Hialina de Mallory

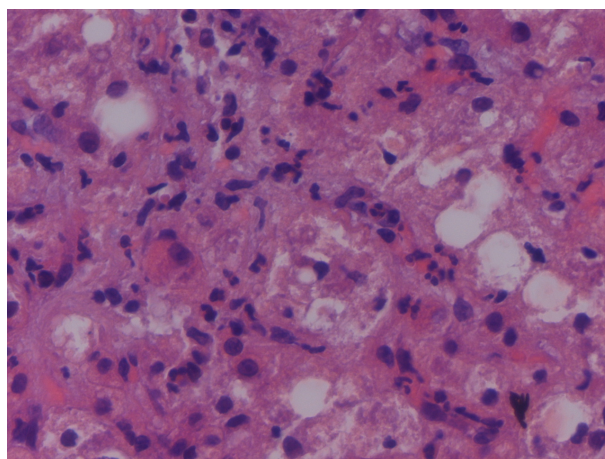


Figura 4.3. Aumento de la figura 4.2 con PMN y E. macrovacular con lisis hepatocitaria.

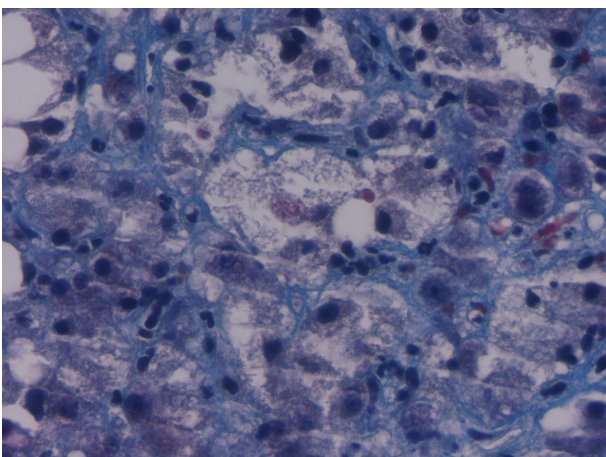


Figura 4.4. HAA teñida con T. de Masson

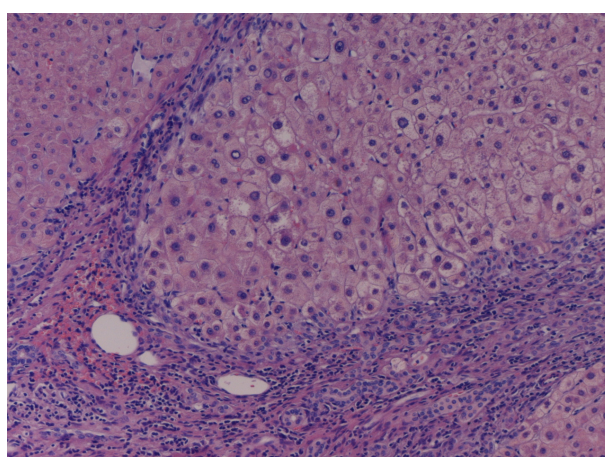


Figura 4.5. H. alcohólica evolucionada, con puentes porto-portales y portocentrales. Moderada inflamación linfocitaria en cuñas activas en porción periférica del lóbulo.

historia familiar, síntomas relacionados con alcoholismo y complicaciones, conducta antisocial-delitos (donde incluye problemas laborales, violencia doméstica o en la calle, accidentes de tráfico relacionados con el alcohol), datos de alcoholdependencia. Concluye que aquellos con mutación c2 muestran significativamente mayor proporción de delitos y conducta antisocial que aquellos homocitotos c1/c1, asimismo encuentra una asociación algo más débil estadísticamente entre enfermedad hepática alcohólica y mutación, al igual que otros autores en población caucásica (**Grove J 1998**) por el

contrario no encuentra diferencias en ambos grupos en cuanto a otras complicaciones del alcoholismo como síndrome de abstinencia, demencia, alucinosis alcohólica (**Nakamura K 2003**)

4. PAPEL DEL POLIMORFISMO C2 DE CYP2E1 EN LA PATOGÉNIA DE LA HAA

En resumen, los resultados mostrados en el presente estudio ponen de manifiesto la conveniencia del estudio de polimorfismos genéticos de CYP 2E1 como marcadores de HAA en consumidores crónicos excesivos de alcohol. En este sentido, el estu-

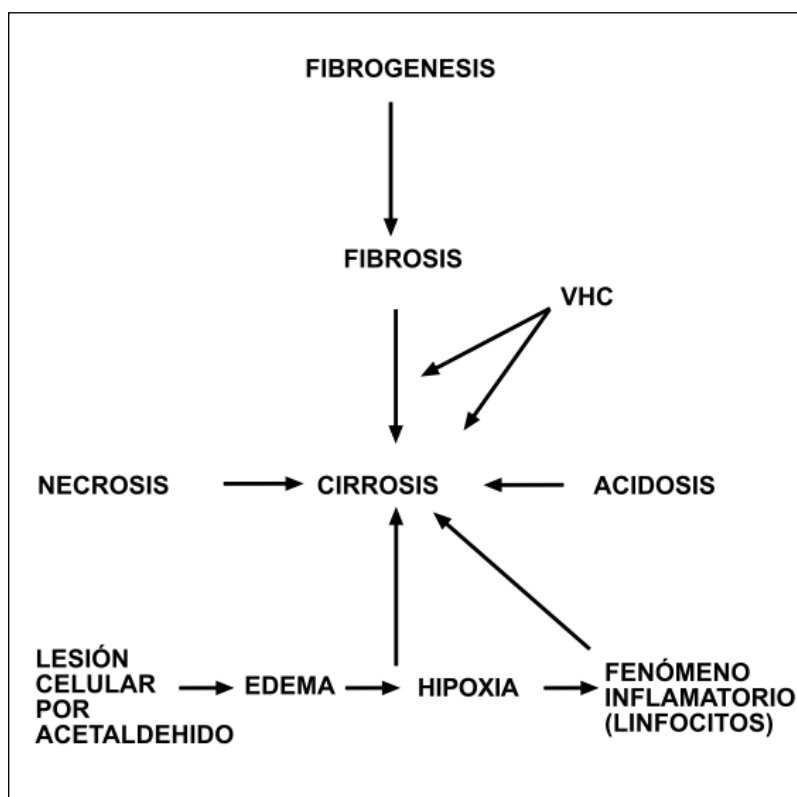


Figura 4.6

dio de los enzimas implicados en el metabolismo del etanol, especialmente la relación existente entre la presencia de alelos c2 de CYP2E1 y el desarrollo de HAA representa actualmente una gran oportunidad en cuanto a la detección precoz de individuos de alto riesgo, no tanto en su predisposición a un consumo excesivo de alcohol como en la determinación de susceptibilidades genéticas al desarrollo de enfermedades hepáticas. Adicionalmente la HAA no es un evento banal o de escasa mortalidad dentro de la Enfermedad Hepática Alcohólica sino que su mortalidad a medio plazo se sitúa en torno al 30 % (Naveau S 2001). Histológicamente se desarrolla fundamentalmente en la región centrolobulillar.

El papel del SISTEMA MEOS en la patogénia y progresión de la enfermedad hepática alcohólica es importante según la teoría de la LIPOPEROXIDACIÓN (Lieber CS 2000). La consecuencia más importante de la activación de este sistema según

esta teoría sería el estrés oxidativo que conllevaría una depleción de sistemas antioxidantes como el GLUTATION, lo que favorece la peroxidación lipídica, el reclutamiento de leucocitos (Afford SC 1998) y el daño celular (Naveau S 2001). La presencia del alelo c2 determinaría una actividad transcripcional mayor, una mayor formación de acetaldehído, y por tanto una acentuación de las alteraciones de la membrana del hepatocito, del desequilibrio redox y de los fenómenos inflamatorios y de necrosis celular en la región centrolobulillar (FIGURAS 4.3, 4.4 y 4.5) que conducen al desarrollo de HAA a través de la teoría de la lipoperoxidación y la inducción de citoquinas específicas (Afford SC 1998). Estas conducen bien a fenómenos inflamatorios a nivel centrolobulillar con infiltrado de PMN o bien a inflamación crónica sobre todo linfocitos y fenómenos fibrosos que conducen a la fibrosis-cirrosis a medio o largo plazo (FIGURA 4.6).

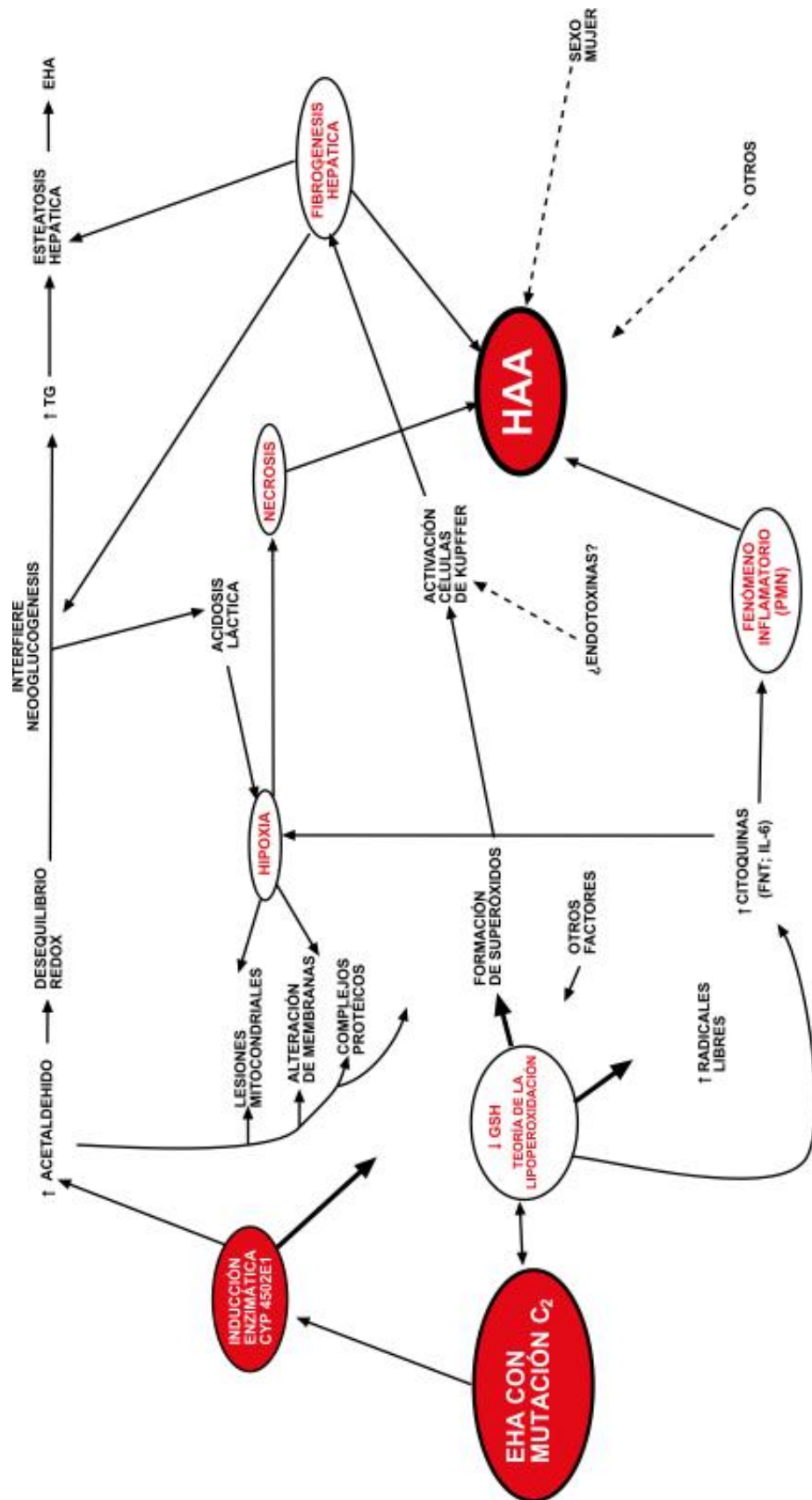


Figura 4.7

Esta explicación patogénica de HAA y cirrosis se ha reflejado en las **FIGURAS 4.6 y 4.7**.

A partir del estudio que se ha realizado se podría establecer una nueva posibilidad en cuanto al origen de la HAA: el desarrollo de hepatitis alcohólica aguda estaría relacionado con la presencia de alelos c2 del CYP 2 E1, de modo que ante dos pacientes bebedores crónicos con activación del sistema MEOS, sería en último termino la genética de los mismos la que determinaría el desarrollo o no de HAA y las consecuencias fatales en un alto porcentaje de casos como se demuestra en esta serie. Todo ello debe llevar a estudios con series más amplias diferenciando dos grupos de bebedores crónicos: los que desarrollan HAA y su genética, los que no desarrollan HAA y su genética CYP 2E1. La presencia de la mutación Rsa I del CYP2E1 permitiría la identificación precoz de individuos susceptibles a desarrollar HAA en pacientes con Enfermedad Hepática Alcohólica en diferentes estadios, lo cual no ocurre con otros posibles marcadores como la ADH, los marcadores clásicos, los leucocitos o la BR cuya elevación es más una conse-

cuencia que un factor predisponente de HAA. Adicionalmente podría permitir la identificación de familiares potencialmente afectados de alguna mutación, llevando a cabo medidas preventivas fundamentalmente en los bebedores moderados-altos y excesivos. La búsqueda e identificación de nuevas mutaciones en estos genes implicados en el metabolismo del etanol supone un enorme estímulo habida cuenta de las características de estas patologías y sobre todo del hecho de que determinados polimorfismos no descritos en poblaciones de origen caucásico pueden aportar luz en cuanto a la explicación a determinadas cuestiones patogénicas y epidemiológicas, en relación con las patologías asociadas a un consumo excesivo de alcohol, y sobre todo de sus formas más graves como la HAA, y quizás también de otras enfermedades relacionadas con el alcohol como la pancreatitis crónica, hepatocarcinoma o complicaciones del mismo como el síndrome de abstinencia, e incluso poder explicar la "tipología antisocial" de determinadas personalidades del alcohólico, todo ello requeriría estudios más amplios y en diversas etnias para llegar a conclusiones que permitan su generalización.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación permiten elevar las siguientes conclusiones:

1. Los marcadores biológicos clásicos de etilismo continúan siendo instrumentos validos en la práctica clínica siendo los de mayor eficacia la GGT y el VCM. La eficacia de los marcadores clásicos radica en su elevado valor predictivo negativo, permitiendo descartar consumo moderado o excesivo en pacientes con hepatopatía.
2. Se ha señalado la importancia de unificar criterios en cuanto a métodos en los diversos estudios de marcadores biológicos de etilismo: especificar consumo de alcohol, diferenciar grupos de bebedores, tipos de lesión hepática mediante diagnóstico histológico, unificar valores de referencia y diferenciar por género.
3. La leucocitosis y la bilirrubina superior a 8 mg/dl son específicos como marcadores de HAA aunque su sensibilidad es escasa.
4. No se han encontrado individuos homocigotos para ninguna de las mutaciones analizadas. Por lo que respecta a las mutaciones R369C de ADH2*3 y E487K de ALDH2*2 no se ha detectado en ninguna de las muestras analizadas, siendo todos los individuos normales para estas mutaciones. La mutación R47H del genotipo ADH2*1/*2 fue encontrada en 23 % de los individuos en el grupo 1, 9 % en el grupo 2, 13 % en el grupo 3 y 14 % en el grupo 4. En lo referente a las mutaciones analizadas en el CYP2E1 se determinaron unas frecuencias del genotipo c1/c2 de 7 % en el grupo 1, 15 % en el grupo 2, 45 % en el grupo 3, 7 % en el grupo 4.
5. La prevalencia del alelo ADH2*2 en pacientes abstemios con hepatopatía no etílica es dos veces superior a la observada en los grupos de pacientes bebedores, lo cual sugiere la idea del posible papel protector que puede ejercer la mutación R47H del gen ADH2 frente al consumo excesivo de alcohol.
6. No se observan diferencias estadísticamente significativas ni clínicamente relevantes de los alelos ADH 2*2 y ALDH2 *2 al comparar pacientes con hepatopatía alcohólica sin HAA y aquellos con hepatopatía alcohólica y HAA.
7. En el grupo de población estudiado, se observa una clara asociación entre el desarrollo de HAA y la presencia del alelo c2 de CYP 2E1, lo cual puede tener una importancia relevante en la detección precoz de individuos de riesgo en cuanto a la predisposición genética al desarrollo de HAA en situaciones de consumo excesivo de alcohol.
8. La asociación mutación c2-HAA puede ayudar a interpretar correctamente los criterios fisiopatológicos de lesión y pronóstico de la enfermedad permitiendo explicar, a partir de la activación del sistema MEOS y la teoría de la lipoperoxidación, la patogenia de la HAA y aclarar porque no todos los bebedores excesivos ni todos los pacientes con hepatopatía alcohólica desarrollan HAA.
9. La investigación de polimorfismos genéticos de los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo del etanol, puede ser de gran importancia para establecer criterios de riesgo en población general, bebedores de riesgo y alcohol dependientes.

6. Bibliografía

- Afford SC, Fisher NC, Neil DA, Fear J, Brun P, Hubscher SG et al.** "Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis".
- Aguilera MT, De la Sierra A, Coca A, Estruch R, Fernández-Solá J, Urbano A.** "Effect of alcohol abstinence on blood pressure: assesment by 24-hour ambulatory blood pressure monitoring". *Hipertensión* 1999; 33: 653-657.
- Agúndez J, Ladero J, Diaz-Rubio M, Benítez J.** "Rsa I polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus is not related to the risk of alcohol-related severe liver disease". *Liver* 1996; 16: 380- 383.
- Alarcón C.** "El abordaje familiar en el alcoholismo". V Congreso Iberoamericano de Drogodependencias y alcoholismo. Crefat. Madrid 1989.
- Allen JP, Litten RZ, Fertig JB, Sillanaukee P.** "Carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyl transferase, and macrocytic volume as biomarkers of alcohol problems in women". *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24 (4): 492-496.
- Altman J, Everitt BJ, Glautiers S, Markon A, Nutt D, Oretti R et al.** The biological social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. *Psychopharmacology* 1996; 125: 285-345.
- Alvarez FJ, Del Río MC, López T.** *Alcohol, drogas y medicamentos en conductores fallecidos en accidentes de circulación en España 1991- 2000*. Universidad de Valladolid. Consejería de Sanidad y Bienestar Social de Castilla y León. Valladolid 2001.
- Antón RF, Stout RL, Roberts JS, Allen JP.** "The effect of drinking intensity and frequency on serum carbohydrate deficient transferrin and gamma-glutamyl transferase levels in outpatient alcoholics". *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22(7): 1456- 1462.
- Aragón C, Miguel M, Correa M, Sanchís-Segura C.** "Alcohol y Metabolismo Humano". *Addicciones* 2002; 14(1): 23-42.
- Auba J, Serrano M, Frutos D, Mira M.** "Rendimiento de las pruebas de laboratorio en la detección de bebedores excesivos en el medio laboral". *Med Clin (Barc)* 1993; 100: 5- 8.
- Avila J, Pérez A, Rodríguez M.** "Análisis retrospectivo de una muestra de mujeres alcohólicas". *Addicciones* 1986; 9 (4).
- Bailey RJ, Krasner N, Eddleston AL, Williams R, Tee DE, Doniach T et al.** "Histocompatibility antigens, autoantibodies, and immunoglobulins in alcoholic liver disease". *Br Med J* 1976; 25 (2): 727-729.
- Barbatis C, Woods J, Morton JA, Fleming KA, McMichael A.** "Immunohistochemical analysis of HLA (A, B, C) antigens in disease using a monoclonal antibody". *Gut* 1981; 22(12): 985-991.
- Beilin LJ, Puddey IB.** "Alcohol and hypertension". *Clin Exp Hyperten* 1992; 14: 119- 138.
- Bell H, Nordhagen R, Orjasaeter H.** "Association between HLA-B40 and acute alcoholic hepatitis with cirrhosis and the lack of relation between carcinoembryonic Antigen and HKA antigens in alcoholic liver disease". *Scand J Gastroenterol* 1983; 18 (2): 267-271.
- Berglund M, Öjehagen A.** "The influence of alco-

hol drinking and alcohol use disorders on psychiatric disorders and suicidal behavior". *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 333S- 345S.

-Bernadt MW. "Comparison of questionnaire and laboratory test in the detection of excessive drinking and alcoholism". *Lancet* 1982; 1:325-328.

-Berry R, Boland J. *The economic costs of alcohol abuse*, 1972. Brookline, MA: Policy Analysis Inc, 1973.

-Bierut LJ, Dinwiddie SH, Blegerter H et al. "Familial transmission of substance dependence: alcohol, marijuana, cocaine, and habitual smoking: a report from the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism". *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55: 982-988.

-Bigatello LM, Broitman SA, Fattori L et al. Endotoxemia, encephalopathy and mortality in cirrhotic patients. *Gastroenterol* 1987; 82: 11- 15.

-Bisson JI, Milford-Ward A. "A comparison of carbohydrate-deficient transferrin with other markers of alcohol misuse in male soldiers under the age of thirty". *Alcohol Alcohol* 1994; 29: 315- 321.

-Bilir BM. "Trastornos inflamatorios hepáticos". En: **Freston JW**, editor. *Enfermedades hepáticas. Digestive Diseases Self-Education Program (DDSEP)*. Barcelona: Medical Trends 2000; 9-13

-Bode C, Kluger V, Bode JC. "Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess". *J Hepatol* 1987; 4(1): 8-14.

-Borrás E, Coutelle Ch, Rosell A et al. "Genetic

Polymorphism of alcohol dehydrogenase in Europeans: The ADH 2*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated with ADH 3*1". *Hepatology* 2000; 31 (4): 984- 989.

- Bosron WF, Li TK. "Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism", *Hepatology* 1986; 6: 502-510.

-Bouchardy C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward PJ, Dayer P, Benhamou S. "Role of alcoholic dehydrogenase 3 and cytochrome P-4502E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract". *Int J Cancer* 2000; 87: 734- 740.

-Brismar B, Bergman B. "The significance of alcohol for violence and accidents". *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 229S- 306S.

-Brown ZW, Amit Z, Smith BR. "Intraventricular self-administration of acetaldehyde and voluntary consumption of ethanol in rats". *Behav Neural Biol* 1980; 28: 150- 155.

-Burbige EJ, Lewis DR Jr, Halsted CH. "Alcohol and the gastrointestinal tract". *Med Clin N Am* 1984; 68: 77- 89.

- Burnell JC, Carr LG, Dwulet FE, Edenberg HJ, Li TK, Bosron WF. "The human beta 3 alcohol dehydrogenase subunit differs from beta 1 by a Cys for Arg-369 substitution which decreases NAD (H) binding". *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 146: 1127-1133.

-Burra P, Hubscher SG, Shaw J, Elias E, Adams DH. "Is the intercellular adhesion molecule-1/leukocyte function associated antigen 1 pathway of leukocyte adhesion involved in the tissue damage

of alcoholic hepatitis ?" *Gut* 1992; 33: 268-271.

-Bush B, Shaw S, Cleary P, Delbanco TL, Aronson MD. "Screening for alcohol abuse using CAGE questionnaire". *Am J Med* 1987; 82: 231-235.

-Butters N. "Alcoholic Korsakoff's Syndrome: an update". *Sem Neurol* 1984; 4: 226- 244.

-Caballería J, Montull S, Parés A. "Malnutrición en el alcoholismo crónico. Importancia en la fisiopatología y tratamiento de la hepatopatía alcohólica". *Gastroenterol Hepatol* 1991; 14: 82-89.

-Caballería J, Caballería LL, Parés A. *Enfermedad hepática alcohólica. Medicine* 2000; 8: 435-441.

-Caballería J. "Hepatitis alcohólica aguda". En: Tratamiento de las enfermedades hepáticas y biliares. Asociación Española para el estudio del hígado 2001; 91-98.

-Carr LG, Hartleroad JY, Liang Y, Mendenhall C, Moritz T, Thomasson H. "Polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus is not associated with alcoholic liver disease in Caucasian men". *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 182- 184.

-Casado MA, Álvarez S, Martínez ML, Utilibarri S, Rubio G, Marin J et al. "Comparación de pruebas de laboratorio y psicométricas en la detección del alcoholismo en el hospital general". *An Ps* 1996; 12(6): 232-235.

-Casas M, Guardia J. "Patología Psiquiátrica asociada al alcoholismo". En: Gual A (editor). *Addicciones*. Madrid 2002;14, suppl 1: 195- 219.

-Chad DA. "Disorders of nerve roots and plexures".

En: Bradley W et al (eds). *Neurology in clinical practice*. Boston: Butterworth-Heinemann 2000; 2019- 2044.

-Chao HM. "Alcohol and the mystique of flushing". *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19:104-109.

-Chao YC, Liou SR, Chung YY, et al. "Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase genes and alcoholic cirrhosis in Chinese patients". *Hepatology* 1994; 19: 360-366.

-Charness ME, Simon RP, Greenberg DA. "Ethanol and the nervous system". *N Engl J Med* 1989; 321: 442- 454.

-Chedid A, Mendenhall CL, Gartside P, French SW, Chen T, Rabin L. "Prognostic factors in alcoholic liver disease. VA Cooperative Study Group". *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 210-216.

-Chen CC, Lu RB, Chen YC, Wang MF, Chang YC, Li TK et al. "Interaction between the functional polymorphism of the alcohol-metabolism genes in protection against alcoholism". *Am J Hum Genet* 1999; 65: 795-807.

-Cherpitel C. "Alcohol and injuries: a review of international emergency room studies". *Addiction* 1993; 88: 923-937.

-Cirera E, Vilalta J, Palomero E. "Alcoholismo en el hospital general. Estudio epidemiológico". *Med Clin (Bar)* 1985; 85: 96-98.

-Clark WD. "Alcoholismo: obstáculos para el diagnóstico y tratamiento". *Am J Med* 1981; 71: 136-147.

-Cleary PD, Miller M, Bush BT, Warburg MM,

Delbanco TL, Aronson MD. "Prevalence and recognition of alcohol abuse in a primary care population". *Am J Med* 1988; 85: 466-471.

-Clement S. "The identification of alcohol related problems by general practioners". *Br J Addiction* 1986; 81: 257-263.

-Collins DJ, Lapsley HM. "Estimating the Economic Cost of Drug Abuse in Australia". National Campaign Agaisnst Drug Abuse. Monograph Series 15. Canberra: Australian Government Printing Service, 1991.

-Comunidad de Madrid. "Informe: Hábitos de salud en población juvenil de la Comunidad de Madrid 2001". Boletín epidemiológico de la Comunidad de Madrid 2001; 7 (11): 1-42. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.

-Conigrave KM, Saunders JB, Whitfield JB. "Diagnostic test for alcohol consumption. Alcohol Alcohol 1995"; 30 (1): 13-26.

-Cooksley W. "Chronic Liver disease: do alcohol and hepatitis C interact". *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11 (2): 187- 192.

-Couzigou P, Fleury B, Groppi A, Cassaignes A, Begueret J, Iron A and the French Grorup for Reseca on Alcohol and Liver. "Genotyping study of alcohol dehydrogenase class I polymorphism in French patients with alcohol cirrhosis". *Alcohol Alcohol* 1990; 25: 623- 626.

-Couzigou P, Fleury B, Groppi A, Iron A, Coutelle C, Cassaigne A, Begueret J. "Role of alcohol dehydrogenase polymorphism in ethanol metabolism and alcohol-related diseases". *Adv.*

Exp Med Biol. 1991; 284: 263-70.

-Crabb DW, Edenberg HJ, Bosron WF, Li TK. "Genotypes for aldehyde deficiency and alcohol sensitivity". *J Clin Invest* 1991; 110 (4): 314-317.

-Day CP, Bashir R, James OFW, Bassendine MJ, Crabb DW, Thomasson HR et al. "Investigation of the role of polymorphism at the alcohol and aldehyde dehydrogenase loci in genetic predisposition to alcohol-related end-organ damage". *Hepatology* 1991; 14: 798- 801.

-Deitrich RA. "The especifitiy of ethanol". En: *Advances on biomedical alcohol research* 1987; 131- 138. Lindros KO (ed). Pergamon Press, New York, 1987.

-Del Rio C, Alvarez FJ. "Presence of illegal drugs in drivers involved in fatal road traffic accidents in Spain". *Drug Alcohol Depend* 2000; 57:177-182

Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (PNSD). "Observatorio Español sobre Drogas. Encuesta sobre consumo de drogas en la Comunidad Autónoma de Madrid. Madrid, 2001".

-Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Observatorio Español sobre Drogas (PNSD). "Indicadores de Tratamiento Urgencias y Mortalidad: Informe año 2001. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas". Madrid, 2002.

-Diaz RM, Gual A, Serrano L, Costa S, Ferri MJ, Grau C. "Programa alfil: evaluación de marcadores de riesgo e intervención preventiva en hijos de alcohólicos". *Addicciones* 2001; 13 (1): 39-49.

- Djordjevic D, Nikolic J, Stefanovic V.** "Ethanol interactions with other cytochrome P 450 substrates, drugs, xenobiotics, and carcinogens". *Pathol Biol* 1998; 46: 760-770.
- Eckardt MJ, Ryback RS, Rawling RR.** "Biochemical diagnosis of alcoholism. A test of the discriminating capabilities of gamma-glutamyl-transpeptidase and mean corpuscular volume". *JAMA* 1981; 246: 2707-2710.
- Edenberg HJ, Brown CJ.** "Regulation of human alcohol dehydrogenase genes". *Pharmacogenetics* 1992; 2: 185-196.
- Encinas A, Cano J.M, Cerezo E.** "Hepatopatía alcohólica". En: **Encinas Sotillos A**, ed. *Actualizaciones temáticas en Gastroenterología*. Barcelona: Madaus, 1997.
- Elzo J.** *Sociología y epidemiología de los consumos*. En: *Drogas: nuevos patrones y tendencias de consumo*. Madrid: Ediciones Doce Calles, 2000; 14-38.
- Enomoto N, Takase S, Takada N, Takada A.** "Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 genes". *Hepatology* 1991; 13: 1071- 1075.
- Ericksson CJP, Fukunaga T, Sarkola T, Chen WJ, Chen CC, Ju JM et al.** "Functional relevance of human ADH polymorphism". *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25 (Suppl 5): 157 S- 163 S.
- Eriksson CJP.** "The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000)". *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 25 (5): 15 S- 32 S.
- Ewing JA.** "Detecting alcoholism. The CAGE questionnaire". *JAMA* 1984; 252 (14): 1905- 1907.
- Farfán A, Gómez M, Martínez MC, Cuenca C, Girones JM, García-Castaño J.** "Síndrome de abstinencia alcohólica: manifestaciones clínicas, analíticas y tratamiento". *An Med Intern* 1997; 14: 604-606.
- Farres H, Takahasi K, Cunningham SJ et al.** "Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase: A model to study human (Oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase". *J Biol Chem* 1994; 269: 1354-1368.
- Felver ME, Mezey E, McGuire M, Mitchell MC, Herlong HF, Veech GA et al.** "Plasma tumor necrosis factor-alpha predicts decreased long term survival in severe alcoholic hepatitis". *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14: 255-259
- Fernández S, Junyent JM, Urbano A.** "Alcoholic myopathies". *Curr Opin Neurol* 1996; 9: 400-405.
- Fernández –Solá J, Nicolás JM, Paré JC, Sacanella E, Fatjo F, Cofan M, Estruch R.** "Diastolic function impairment in alcoholics". *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 1830-1835.
- Forrest EH, Evans CD, Murray LS, Morris AJ.** "The acute alcoholic hepatitis scoring system (Glasgow) improves the prediction of short and medium-term mortality. *Hepatology* 2003; Suppl 1 , 38 (4): 224.
- Friedman SL.** "Stellate cell activation in alcoholic fibrosis. An overview. *Alcoholism Clin Exp Res* 1999; 23: 904-910.
- Fujimoto M, Uemura M, Kojima H, Ishii Y, Ann T,**

- Sakurai S et al.** "Pronostic factors in severe alcoholic liver injury. Nara Liver Study Group". *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 33S- 38S.
- García-Montes JM, Hergueta P, Pellicer F, Gancedo R, Saenz R, Cifuentes C et al.** "Hígado". En: **Díaz-Rubio M**, ed *Aparato Digestivo. Libro del año*. Madrid: Saned SA 1997; 113- 181.
- Garro AJ, Lieber CS.** "Alcohol and cancer". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 219 -249
- Gavaler JS, Van thiel DH.** "Reproductive consequences of alcohol abuse: Males and females compared and contrasted". *Mut Res* 1987; 186: 269-277.
- Gianoulakis C, Dewaele JP, Thavundayil J.** "Implication of the endogenous opioid system in excessive ethanol consumption". *Alcohol* 1996; 13: 19-23.
- Gilder FJ, Hodgkinson S, Murray M.** "ADH and ALDH genotype profiles in Caucasians with alcohol-related problems and controls". *Addiction* 1993; 88: 383- 388.
- Gill K, Menez JF, Lucas D.** "Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue". *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 910- 915.
- Gilt T in: M.Soyka (Ed).** *Die Alkoholkrankheit-Diagnose und Therapie*, Chapman and Hall, Weinheim, 1995; 79.
- Gippini A, Rodríguez I, Torre A et al.** "Síndrome de abstinencia alcohólica en el Servicio de Medicina Interna de un hospital general;epidemiología y coste hospitalario". *An Med Intern* 1990; 7:171-173.
- Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tack-**
- mann D, Singhs S, Beckmann G et al.** "Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations". *Hum Genet* 1992; 88: 344-346.
- Gómez-Rabago ML, Gómez R.** "Valoración del consumo de alcohol en estudiantes de derecho y medicina de la Universidad Complutense de Madrid". *Semergen* 2001; 27 (7): 340-347.
- González-Luque JC.** "Alcohol y accidentes de tráfico". *Jano* 1988; 54(nº1240): 214-217
- Granda MJ, Segado A.** "Valoración e interpretación analítica del etanol en biofluidos y aire respirado: Urgencias Médicas por Etanol". Plan de formación continuada para médicos forenses. Centro de estudios jurídicos de la administración de justicia. Madrid, 28-30 de junio de 1998.
- Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Gottshan A, Schnor P, Hein HO et al.** "Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer". *Ann Intern Med* 2000, 131: 411-419
- Grove J, Brown AS, Daly AK, Bassendine MF, James OF, Day CP.** "The Rsa I polymorphisms of CYP2E1 and susceptibility to alcoholic liver disease in Caucasians:Effect on age of presentation and dependence on alcohol dehydrogenase genotype". *Pharmacogenetics* 1998; 8 (4): 335- 342.
- Guengerich FP.** "Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes". *J Biol Chem* 1991; 266: 1019- 1022.
- Guerri C.** "Cómo actúa el alcohol en nuestro cerebro". *Trastornos Adictivos* 2000; 2 (1): 14-25.
- Gutierrez-Fisac JL.** *Indicadores de consumo de*

alcohol en España. Med Clin (Barc) 1995; 104: 544-550.

-Hall W, Zador D. "The Alcohol withdrawal syndrome". *Lancet* 1997; 349: 1897-1900.

-Hanis CL, Hewett-Emmett D, Bertin TK, Schucil WJ. "Origins of U.S Hispanics. Implications for diabetes". *Diabetes Care* 1991; 14: 618- 627.

-Hart CL, Smith GD, Hole DJ, Hawthorne VM. "Alcohol consumption and mortality from all causes, coronary heart disease and stroke: results from a prospective cohort study of Scottish men with 21 years of follow-up". *British Med J* 1999; 318: 1725-1729.

-Harwood H, Fountain D, Livermore G. "The economic cost of alcohol and drug abuse in the United States, 1992". NIH Publication 98-4327. Bethesda, MA: National Institutes of Health, 1998.

- Hayasi S, Watanabe J, Kawajiri K. "Genetic polymorphism in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450E1 gene". *J Biochem* 1991; 110: 559-565.

-Heien DM, Pittman DJ. "The external costs of alcohol abuse". *J Studies Alcohol* 1993; 54: 302 307.

-Hermansson U, Helander A, Huss A, Brandt L, Ronnberg S. "The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) and carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in a routine workplace health examination". *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24 (2): 180- 187.

-Herrera A, Riera M, Climent B. "Enfermedades hepáticas en el anciano". En: **Herrera A, Enfermedades del hígado**. Valencia: Editorial Artes gráfica.

1999; capítulo 48: 449- 458.

-Herrera A, Ruiz A, González B. "Hígado y alcohol". En: **Herrera A. Enfermedades del Hígado**, 1999. Valencia: Editorial Artes Gráficas. 1999; cap. 30: 333- 344.

-Higuchi S, Matsushita S, Muramatsu T, Murayama M, Hayshida M. "Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and drinking behavior in Japanese.Alcohol" *Clin Exp Res* 1996; 20: 493-497.

-Higuchi S, Suzuki K, Yamada K, Parrish K, Kono H. "Alcoholics with eating disorders prevalence and clinical cours. A study from Japan". *Br J Psy* 1993; 162: 403-406.

- Higuchi S. "Polymorphims of ethanol metabolising enzyme genes and alcoholism". *Alcohol Alcohol* 1994; 29 (supl 2): 29-34.

-Hillman A, Sykes RAD, McConnell AA. "Limitations in the use of gamma-glutamyltransferase estimations in alcohol-dependent subjects". *Alcohol and Alcoholism* 1998; 33 (6): 626- 630.

-Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H. "The Human CYP2E1 gene and lung cancer: Dra I and Rsa I restriction fragment length polymorphisms in a Finnish study population". *Carcinogenesis* 1993; 14: 85- 88.

-Hoecnicka J, Ampuero I, Ramos JA. "Aspectos genéticos del alcoholismo". *Trastornos Adictivos* 2003; 5(3): 213- 222.

-Hoog JO, Heden LO, Larsson K, Jornvall H, von Bahr-Lindstrom H. "The gamma 1 and gamma 2 subunits of human liver alcohol dehydro-

genase. cDNA structures, two amino acid replacements, and compatibility with changes in the enzymatic properties". *Eur J Biochem* 1986; 159:215-8.

- **Hsu LC, Yoshida A, Mohandas T.** "Chromosomal assignment of the genes for human aldehyde dehydrogenase-1 and aldehyde dehydrogenase -2". *Am J Hum Genet* 1986; 38: 641-648.

- **Hu Y, Ingelman-Sundberg M, Lindros KO.** "Induction mechanisms of cytochrome P 450 2E1 in the liver: Interplay between ethanol treatment and starvation". *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 155-165.

-**Humbert M, Vilalta J, Tresserra J et al.**"Detección del alcoholismo en el hospital general. Instrumentos psicométricos y biológicos". *Med Clin (Barc)* 1987; 88: 670-673.

-**Hunt WA.** "Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain-A review". *Alcohol* 1996; 13: 147- 151.

Ichai P, Azoulay D, Feray C. "Pneumocystis carinii and cytomegalovirus pneumonia after corticosteroid therapy in acute severe alcoholic hepatitis: 2 case reports". *Gastroen Clin Biol* 2002; 26(5): 532-534.

-**Instituto de Toxicología.** "Memoria del Análisis toxicológico en accidentes de tráfico. Año 2000". Instituto de Toxicología.Ministerio de Justicia. Madrid 2001.

Iwahashi K, Matsuo Y, Suwaki H, Nakamura K , Ichikawa Y. "CYP2E1 and ALDH2 genotypes and alcohol dependence in Japanese". *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 564-566.

-**Jennet RB, Sorrell MF, Saffari-Fard A, Ockner JL, Tuma DJ.** "Preferential covalent binding of acetaldehyde to the α -chain of purified rat liver tubulin". *Hepatology* 1989; 9: 57-62.

-**Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CI et al.** "A model to predict survival in patients with end-stage liver disease". *Hepatology* 2001; 33: 464- 470.

-**Kapur A, Wild G, Milford A, Triger DR.** "Carbohydrate deficient transferrin: a marker for alcohol abuse". *Br Med J* 1989; 299: 427-431.

-**Kato S, Onda M, Matsukara N, Tokunaga A, Tajiri T, Kim DY et al.** "Cytochrome P4502E1 genetic polymorphism in a case-control study of gastric cancer and liver disease". *Pharmacogenetics* 1995; 5: 141 S- 144 S.

-**Keenan JP, Freeman PR, Harrell R.** "The effects of family history, sobriety length and drinking history in younger alcoholics on P300 auditory-evoked potentials". *Alcohol* 1997; 32: 233- 239.

- **Kitson KE, Weiner H.** "Ethanol and acetaldehyde metabolism: past, present and future". *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 82A-2A.

-**Konishi T, Calvillo M, Leng AS, Feng J, Lee T, Lee H et al.** "The ADH 2*3 and CYP2E1 c2 alleles increase the risk of alcoholism in Mexican American men". *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 183-189.

- **Koop DR.** "Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P 450 2E1". *FASEB J* 1992; 6: 724-730.

-**Koskinen P, Kupari M, Leinonen H.** "Role of alcohol in recurrences of atrial fibrillation in persons

<65 years of age". *Am J Cardiol* 1990; 66: 954-958.

-Kristenson H, Trell E, Hood B. "Serum gamma-glutamyl-transferase in screening and continuous control of heavy drinking in middle-age-men". *Am J Epidemiol* 1981; 114: 862-872.

-Kupari M, Koskinen P. "Alcohol, cardiac arrhythmias and sudden death". *Novartis Found Symp* 1998; 216: 68-79.

-Kupari M, Lindros K, Hillbom M, Heikkilä J, Ylikahri R. "Cardiovascular effects of acetaldehyde accumulation after ethanol ingestion: Their modification by beta-adrenergic blockade and alcohol dehydrogenase inhibition". *Alcohol Clin Exp Res* 1983; 7: 283- 288.

-Kuriyama S, Okuma S, Tomono S, Hirouchi M. "Effects of alcohol and acetaldehyde on metabolism and function of neurotransmitter system in cerebral cortical neurons in primary culture". *Alcohol Alcohol* 1987; suppl 1: 685- 689.

-Kushner MG, Sher KJ, Erickson DJ. "Prospective analysis of the relation between DSM-III anxiety disorders and alcohol use disorders". *Am J Psychiatry* 1999; 156: 723-732.

-Ladero JM, Agúndez JA, Rodríguez-Lescure A, Díaz-Rubio M, Benítez J. "Rsa I polymorphism at the cytochrome P450 2E1 locus and risk of hepatocellular carcinoma". *Gut* 1996; 39:330- 333.

-Ladero JM, García-Agúndez JA, Benítez J. "Enzymatic polymorphism and lung cancer. *Med Clin (Barc)* 1998; 111: 465- 470.

-Lands WEM. "A review of alcohol clearance in humans". *Alcohol* 1998; 15: 147-160.

-Lasker JM, Raucy J, Kubota S. "Purification and characterization of human liver cytochrome P 450-ALC". *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 232- 238.

-Lauer GM, Walker BD. "Hepatitis C Virus Infection". *N Engl J Med* 2001; 345 (1): 41- 52.

-Ledro D, Rebollo J, Torres Y et al. "Estudio descriptivo de los pacientes ambulatorios con enfermedad hepática por alcohol en nuestro medio". *An Med Interna* 2001; 18(11): 569-572.

-Lemmens P. "The alcohol content of self-report and "standard drinks". *Addiction* 1994;89: 593- 602.

-Levine RF, Spivak LJ, Meagher RC, Sieber F. "Effect of ethanol on thrombopoiesis". *Br J Hematol* 1986; 62: 345- 354.

-Li TK. "Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking". *J Stud Alcohol* 2000; 61 (1): 5-12.

-Li Z, Tan W, Shao K. "Susceptibility to lung cancer in Chinese is associated with genetic polymorphism in cytochrome P 4502E1". *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2000; 22: 5- 7.

-Lieber CS. "Alcohol and the liver: 1994 update". *Gastroenterology* 1994; 106: 1085-1105.

-Lieber CS. "Cytochrome P 450 2E1: Its Physiological and pathological role". *Physiol Rev* 1997; 77: 517-544.

-Lieber CS. "Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism." *Clin Chim Acta* 1997; 257: 59-64.

- Lieber CS.** "Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver disease". *Adv Pharmacol* 1997; 38: 601-628.
- Lieber CS.** "Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments". *J Hepatol* 2000; 32 (supl 1): 113-128.
- Lindenbaum J.** "Hematologic complications of alcohol abuse". *Sem Liver Dis* 1987; 7: 169 –181
- Lindros KO.** "Alcoholic liver disease: Pathobiological aspects." *J Hepatol* 1995; 23 (Supl 1) : 7- 15.
- Loew M, Boeing H, Stümer T, Brenner H.** "Relation among alcohol dehydrogenase 2 polymorphism, alcohol consumption, and level of gamma-glutamyltransferase". *Alcohol* 2003; 29: 131- 135.
- Longnecker M.** "Alcohol beverage consumption in relation to risk of breast cancer:meta-analysis and review". *Cancer Causes Control* 1994; 5: 73- 82.
- Lucas D, Menez C, Floch F, Gourlaouen Y, Sparfel O, Joannet I et al.** "Cytocromes P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic caucasians." *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 1033-1037.
- Luster MI, Germolec DR, Yoshida T, Kayama F, Thompson M.** "Endotoxin-induced cytokine gene expresión and excretion in the liver". *Hepatology* 1994; 19: 480-488.
- MacSween RNM, Burt AD.** "Histological spectrum of alcoholic liver disease". *Sem Liver Dis* 1986; 6: 221- 232.
- Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, Weber FL Jr, Mezey E, White RI Jr.** "Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978; 75: 193- 199.
- Maezawa Y, Yamauchi M, Toda G, Suzuki H.** "Alcohol-metabolizing enzyme polymorphism and alcoholism in Japan". *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19:951-954.
- Mailliard ME, Sorrell MF.** "Hepatopatía alcohólica. En: **Harrison TR, Fauci AS, Braunwald E et al** (ed) *Principios de Medicina Interna*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana 2001; 298: 2047-2055.
- Martín AP, Herrero JA, Ferré F, Riojano P.** "Conductas violentas y trastornos de la personalidad en pacientes alcohólicos". *Addicciones* 2000; 12 (1).
- Martinez C, Agúndez JAG, Olivera M et al.** "Influence of genetic admixture on polymorphism of drug-metabolizing enzymes: analyses of mutations on NAT2 and CYP2E1 genes in a mixed Hispanic populations". *Clin Phar Ther* 1998; 63: 623-628.
- Maruyama K, Takashashi H, Matsushita S et al.** "Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in relation to alcoholic chronic pancreatitis in Japan". *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23 (4): 855-915.
- Maruyama S, Hirayama C, Oyake N et al.** "Prevalence of hypoxemia in 102 Japanese patients qith alcoholic and nonalcoholic cirrhosis". *Am J Gastroenterol.* 1999 Oct; 94 (10): 2994-9.
- Matsushita S, Kato M, Muramatsu T, Higuchi S.** "Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes in Korsakoff syndrome". *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24 (3): 337- 340.

- Mayfield DG, Mc Leod G, Hall P.** "The CAGE questionnaire: validation of a new alcoholism screening instrument". *Am J Psy* 1974; 131: 1121-1123.
- Maynard A, Hardman GG, Whelan A.** "Measuring the social cost of addictive substances". *Br J Addiction* 1987; 82: 701-706.
- McClain C, Hill D, Schmidt J, Diehl AM.** "Cytokines and alcoholic liver disease". *Semin Liver Dis* 1993; 170-182.
- McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D.** "Cytokines in alcoholic liver disease". *Semin Liver Dis* 1999; 19: 205-219.
- McCullough AJ, O'Connor JF.** "Alcoholic liver disease: proposed recommendations for the American College of Gastroenterology". *Gastroenterol* 1998; 93: 2022- 2036.
- Melendez M, Vargas L, Fuentes C et al.** "Distribution of HLA histocompatibility antigens, ABO blood groups and Rh antigens in alcoholic liver disease". *Gut* 1979; 20 (4): 288- 290.
- Menon KV, Gores GJ, Shah VH.** "Pathogenesis, diagnosis and treatment of alcoholic liver disease". *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 1021- 1029.
- Merikangas KR, Leckman JF, Pursoff BA, Pauls DL, Weissman MM.** "Familial transmission of depression and alcoholism." *Arch Gen Psychiatry* 1985; 42: 367-372.
- Minian E, Slorid M, Bontiette L.** "Severe alcohol intoxication: a study of 204 consecutive patients." *Clin Toxicol* 1989; 27: 375-384.
- Mizoi Y, Ijiri I, Tatsuno Y, Kijima T, Fujiwara S, Adachi J, Hishida S.** "Relationship between facial flushing and acetaldehyde levels after alcohol intake". *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 13: 19- 23.
- Mondon S.** "Estudio epidemiológico del consumo de bebidas alcohólicas en accidentes de tráfico en los fines de semana". *Addicciones*, 1997; 9 (3): 391- 403.
- Montero FJ, Sánchez C, Clemente V et al.** "Intoxicaciones agudas" II. En: Jiménez L, Montero FJ. *Protocolos de actuación en Medicina de Urgencias*. Ed. Harcourt Brace 1996; 30: 204- 205.
- Monteiro E, Alves MP, Santos ML, Quintas I, Baptista A, Galvao-Teles A, Gavaler JS.** "Histocompatibility antigens: markers of susceptibility to and protection from alcoholic liver disease in a Portuguese population". *Hepatology* 1988; 8 (3): 455-458.
- Montull S, Parés A, Bruguera M, Caballería J, Uchida T, Rodés J.** "Alcoholic foamy degeneration in Spain. Prevalence and clinicopathological features". *Liver* 1989; 9: 79- 85.
- Morse RM, Hurt RD.** "Screening of alcoholism". *JAMA* 1979; 242: 2688-2690.
- Mundle G, Ackermann K, Munkes J, Steinle D, Mann K.** "Influence of age, alcohol consumption and abstinence on the sensitivity of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean corpuscular volume". *Alcohol Alcohol* 1999; 34 (5): 760- 766.
- Muramatsu T, Wang ZC, Fang YR, Hu KB, Yan H, Yamada K et al.** "Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and drinking behavior of

Chinese living in Shanghai". *Hum Genet* 1995; 96: 151-154.

- **Murata M, Tagawa M, Watanabe S, Kimura H, Takeshita T, Morimoto K.** "Genotype difference of aldehyde dehydrogenase 2 gene in alcohol drinkers influences the incidence of Japanese colorectal cancer patients". *Jpn J Cancer Res* 1999; 90 (7): 711-719.

-**Musshoff F, Daldrop Th.** "Determination of biological markers of alcohol abuse". *J Chromatogr B Biomed Sci* 1998; 713 (1): 245- 264.

-**Myers WD, Singer G.** "Intravenous self-administration of acetaldehyde in the rats as a functions of schedule, food deprivation and photoperiod". *Pharmacol Biochem Behav* 1982; 17: 807- 811.

-**Nalpas R, Poupon RE, Vassalult A et al.** "Evaluation of m/AST t AST ratio as a marker o alcohol misuse in a non-select population". *Alcohol Alcohol* 1989; 24: 415-419.

-**Nakamura K, Kazuhiko I, Ameno K, Sekine Y.** "CYP2E1 and clinical features in alcoholics". *Neuropsychobiology* 2003; 47(2): 86- 90.

Navarro J, Gómez E. "El consumo de alcohol." En: *La incidencia de las drogas en el mundo laboral en la Comunidad de Madrid*. En: Consejería de Sanidad y Servicios Sociales y Agencia Antidroga de la Comunidad Autónoma de Madrid, editores. Madrid: Cauce Editorial, 1998; 71-92 y 215-230.

-**Navarro J.** "El alcohol". En: *La incidencia de las drogas en el mundo laboral*, 1996. Fundación de Ayuda contra la Drogadicción, editores. Madrid: Ancares C.B, 1996; 59-75.

-**Naveau S.** "Acute alcoholic hepatitis: treatments". *Presse Med* 2001; 30 (20): 1024- 1030.

-**Naveau S, Abella A, Raynard B, Balian A, Giraud V, Montembault S et al.** Tumor necrosis factor soluble receptor p55 and lipid peroxidation in patients with acute alcoholic hepatitis". *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (12): 3361- 3367.

-**Nebert DW, González FJ.** "P450 genes: structure, evolution and regulation". *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 945- 993.

-**Nelson DR, Koymans L, Kamati T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ et al.** "P 450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accesión numbers and nomenclature". *Pharmacogenetics* 1996; 6: 1- 42.

-**Nicolas JM, Catafan AM, Estruch R, Lomeña FJ, Salamero M, Herranz R et al.** "Regional cerebral blood flow-SPECT in chronic alcoholism: relation to neuropsychological testing". *J Nucl Med* 1993; 34: 1452- 1459.

-**Nilssen O, Huseby NE, Hoyer G et al.** "New alcohol markers-how useful are they in population studies: the Svalbard Study 1988-1989". *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 82-86.

-**Nomura F, Itoga S, Tamura M, Harada S, Izuka Y, Nakai T.** "Biological markers of alcoholism with respect to genotypes of low-Km aldehyde dehydrogenase (ALDH2) in japanese subjects". *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24 (Suppl 4): 30 S- 33 S.

- **Nuutinen HU.** "Activities of ethanol-metabolizing enzymes in liver diseases". *Scand J Gastroenterol*. 1986; 21: 678-684.

- Nuñez-Vergara LJ, Yudelevich J, Squella JA, Speisky H.** "Drug-acetaldehyde interactions during ethanol metabolism in vitro". *Alcohol Alcohol* 1991; 26: 139- 146.
- O'Keefe C, McCormick PA.** Severe acute alcoholic hepatitis: and audit of medical treatment. *Irish Medical Journal* 2002. 95 (4); 108-109.
- Omura T, Sato R.** "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II". *J Biol Chem* 1964; 239: 2379-2385.
- Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S et al.** "Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area". *Rev Neurol (Paris)* 1997; 153: 185-192.
- Ortiz AL.** "La violencia doméstica contra las mujeres". Oficina del Defensor del Pueblo. Madrid 1997.
- Ortiz A, Griffiths PJ, Littleton JM.** "A comparison of the effects of chronic administration of ethanol and acetaldehyde to mice: Evidence for a role of acetaldehyde in ethanol dependence". *J Pharmacy Pharmacol* 1974; 6: 349- 360.
- Panés J, Soler X, Parés A et al.** "Influence of liver disease on hepatic alcohol and aldehyde dehydrogenases". *Gastroenterology* 1989; 97: 708-714.
- Panteghini M, Falsetti F, Chiari E, Malshiodi A.** "Determination of aspartate aminotransferase isoenzymes in hepatic disease-preliminary findings". *Clinica Chimica Acta* 1983; 128: 133-140.
- Papoz L.** "Alcohol consumption in a healthy population. Relationship to gamma-glutamyltransferase activity and mean corpuscular volume". *JAMA* 1981; 245: 1748- 1751.
- Parés A, Barrera JM, Caballería J et al.** "Hepatitis C virus antibodies in chronic alcoholic patients: Association with severity of liver injury". *Hepatology* 1990; 12: 1295 –1299.
- Parés A, Caballería J, Bruguera M Torres M, Rodés J.** "Histological course of alcohol hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage". *J Hepatol* 1986; 2: 33-42.
- Parés A, Caballería J.** "Patología orgánica". En: Gual A (editor). *Addicciones*. Madrid 2002; 14, suppl 1: 155- 173
- Parés X, Farrés J, Parés A et al.** "Genetic polymorphism of liver alcohol dehydrogenase in Spanish subjects: significance of alcohol consumption and liver disease". *Alcohol* 1994; 6: 701-705.
- Parsian A, Cloninger CR, Zhang ZH.** "Association studies of polymorphisms of CYP2E1 gene in alcoholics with cirrosis, antisocial personality and normal controls". *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 888-891.
- Pastoric M, Boyadjieva N, Sarkar DK.** "Comparison of the effects of alcohol and acetaldehyde on proopiomelanocortin mRNA levels and B-endorphin secretion from hypothalamic neurons in primary cultures". *Mol Cell Neurosci* 1994; 5:580- 586.
- Peng GS, Wang MF, Chen CY, Luu SU, Chou HC, Li TK, Yin SJ.** "Involvement of acetaldehyde for full protection against alcoholism by homozygosity of the variant allele of mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene in Asians". *Pharmacogenetics* 1999; 9(4): 463- 476.
- Peris P, Parés A, Gual A et al.** "Bone mass improves in alcoholics after two years of ab-

tinence". *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1607- 1612.

- **Persson J.** "Detection and intervention of excessive drinking in somatic outpatient care". *Alcohol Alcohol* 1991; 26 (Supl 1): 465-472.

-**Pirmohamed M, Kitteringham NR, Quest LJ, Allott RL, Gilmore IT, Green VJ et al.**"Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians". *Pharmacogenetics* 1995; 5: 351-357.

-**Portella E, Ridao M, Salvat C, Carrillo C.**" Costes sanitarios del alcoholismo". *Aten Primaria* 1998; 22: 279-284.

- **Porter TD, Coon MJ.** "Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms". *J Biol Chem* 1991; 266: 13469- 13472.

-**Potter JR, James OFW.** "Clinical features and prognosis of alcoholic liver disease in respect of advancing age". *Gerontology* 1987; 33: 380- 387.

- **Poupon RE, Nalpas B, Coutelle C, Fleury B, Cozigou P, Higuieret D et al.** "Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase activities: implications in alcoholic cirrhosis in white patients." *Hepatology* 1992; 15: 1017-1022.

-**Poynard T, Bedossa P, Opolon P.** "Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C". *Lancet* 1997; 349: 825-832.

-**Prada C, del Rio MC, Yañez JL, Alvarez FJ.** "Mortalidad relacionada con el consumo de alcohol en España: 1981-1990". *Gac Sanit* 1996; 10: 161-168.

-**Pritchard HM.** "Economic cost of abuse and depen-

dency of alcohol in Australia". En: **Kiloh LG, Belles DG,** eds. *Proceedings of the 29th international congress on alcoholism and drug dependence*. February 1970; Sydney, Australia: Butterworths, 1971.

-**Quettermont E, De Witte P.** "Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections". *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 68: 449-454.

- **Reich T, Edenberg HJ, Goate A, Williams JT, Rice JP, Eedewegh PV et al.** "Genome-wide search for genes affecting the of risk for alcohol dependence". *Am J Med Genet* 1998; 81: 207-215.

- **Reynaud M, Schellenger F, Loiseux-Meunier MN et al.** "Objective diagnosis of alcohol abuse: compared values of carbohydrate-deficient transferrin (CDT), gamma-glutamyl transferase (GGT) and mean corpuscular volume (MCV)". *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24 (9): 1414- 1419.

-**Reddy BV, Boyadjeva N, Sarkar DK.** "Effects of ethanol, propanol, butanol and catalase enzyme blockers on b-endorphin secretion from primary cultures of hypothalamic neurons: Evidence for mediatory role on acetaldehyde in ethanol stimulation of B-endorphin release". *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19:339- 344.

-**Renaud SC, Guegen R, Schenker J, d'Houtaud A.**" Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France". *Epidemiology* 1998; 9: 184-188.

-**Ricciardi BR, Saunders JB, Williams R, Hopkinson DA.** "Hepatic ADH and ALDH isoenzymes in different racial groups and in alcoholism". *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 18: 61- 65.

- **Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS, Song BJ.**

"Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: Evidence that CYP 2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less". *Biochem Biophys Res Com* 1994; 205: 1064-1071.

-Robson L, Single E. *Literature Review of Studies on the Economic Cost of Substance Abuse*. Ottawa: Canadian Centre on Substance Abuse, 1995.

-Rodd-Henricks ZA, Zaffaroni A, Goldstein A, Mc Bride WJ, Li TK. "Alcohol Preferring (P) rats self-administer acetaldehyde directly into the posterior VTA". *Alcohol Clin Exp Res* 2000; Suppl 5: 24- 52 A.

-Rodríguez-Martos A, Gual A, Llopis JJ. La "unidad de bebida estándar" como registro simplificado del consumo de bebidas alcohólicas y su determinación en España. *Med Clin (Barc)* 1999; 12: 446-450.

Rosalki S. "Identifying the alcoholic. In: Clinical Biochemistry of Alcoholism". Rosalki S.Ed, Churchill Livingstone.Edinburgh 1984: 65-92.

-Rovira J, Oriols P. *Aproximació al cost social de l'alcoholisme a Catalunya*. Barcelona: Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya, 1982.

-Salaspuro M. "Epidemiological aspects of alcoholic liver disease, ethanol metabolism, and pathogenesis of alcoholic liver injury". En :**J Bircher, JP Benhamou, N McIntyre, M Rizzetto, J Rodés** (ed.). *Oxford Text Book of Clinical Hepatology (2nd edition)*. Oxford University Press. Oxford 1999, pp: 1157-1184.

-Sánchez Pardo L. "Situación actual y evolución

de los consumos de drogas ilícitas en España".I. *Trastornos Adictivos*, 2001; 3(2): 85-94.

-Santo-Domingo J, Rubio G. "Trastornos Psiquiátricos y alcoholismo". En: **Rubio G, Santo-Domingo J.** Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid: *Guía Práctica de Intervención en el Alcoholismo* 2000; 7:143-161.

- Santo-Domingo J. "Alcohol". En: *Consenso de la Sociedad Española de Psiquiatría sobre Diagnóstico y Tratamiento del Alcoholismo y otras Dependencias*. Coordinador Santo-Domingo J.Madrid 2000; cap 2: 47- 72.

-Santo-Domingo J. "Introducción: Evolución del alcoholismo y su asistencia en España". En "Monografía alcohol" Gual A.ed 14 (1) 2002:7-21

-Sanz J "Epidemiología del alcoholismo.Medicina del Trabajo" 1997; 113-118.

-Schiff ER. "Hepatitis C and alcohol.Hepatology" 1997; 26(3, suppl): 395.

-Schuckit MA, Smith TI. "An 8-year folowup of 450 sons of alcoholic and control subjects". *Arch Gen Psychiatry* 1996; 53: 202-210.

- Selzer ML. "The Michigan alcoholism screening test: the quest for a new diagnostic instrument". *Am J Psy* 1971; 127: 1653- 1658.

-Shciele F, Artur Y, Varasteh A, Wellman M, Siest G. "Serum mitochondrial aspartate aminotransferase activity: no useful as a marker of excessive alcohol consumption in an unselected population". *Clinical Chemistry* 1989; 35: 926-930.

-Shea SH, Wall TL, carr LG, Li TK. "ADH2 and

alcohol-related phenotypes in Ashkenazic Jewish American college students". *Behav Genet* 2001; 31: 231-239.

-Shen YC, Fan JH, Edenberg HJ et al. "Polymorphism of ADH and ALDH genes among four ethnic groups in China and effects upon the risk of alcoholism". *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21:1272-1277.

-Sherloch S, Dooley J. "Cirrosis hepática". En: *Enfermedades del hígado y Vías Biliares*. Madrid: Editorial Marban SL. 1996: 357-369.

- Shet M, Riggs M, Patel T. "Utility of the Mayo End-Stage Liver Disease (MELD) score in assessing prognosis of patients with alcoholic hepatitis". *BMC gastroenterology* 2002; 2:1-5.

-Shibuya A, Yoshida A. "Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese with alcohol liver disease: A strong association of the usual Caucasian-type aldehyde dehydrogenase gene (ALDH 2-1) with the disease". *Am J Hum Genet* 1988; 43: 744- 748.

-Sillanaukee P, Olsson U. "Improved diagnostic classification of alcohol abusers by combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase". *Clin Chem* 2001; 47 (4): 681-685.

-Singh M, Simsek. "Ethanol and the pancreas. Current status". *Gastroenterology* 1990; 98: 1051-1062.

-Skog OJ. "Alcohol consumption and overall accident mortality in 14 European countries". *Addiction* 2001; 96 (S1): S35-S47.

-Slutske WS, Eisen S, True WR, Lyons MJ, Goldberg J, Tsuang M. "Common genetic vulnerability for pathological gambling and alcohol dependence in men". *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57: 666- 673.

-Smith BR, Aragon CMG, Amit Z. "Catalase and the production of central acetaldehyde: A possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol". *Addict Biol* 1997; 2: 277-289.

-Smith G, Branas CC, Miller TR. "Fatal nontraffic injuries involving alcohol: a metanalysis". *Ann Emerg Med* 1999; 33: 659-668.

- Song BJ, Cederbaum AI. "Ethanol inducible cytochrome P (CYP 2E1): Biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 Update". *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20 138 A- 146 A.

-Spencer-Peet J, Wood D, Glatt MM. "Gammaglutamyltranspeptidase in alcoholism". *Lancet* 1972; 1:1120-1123.

-Stephens EA, Taylor JA, Kaplan N et al. "Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese". *Pharmacogenetics* 1994; 4: 185- 192.

-Sttetter F, Gaertner HJ, Wiatr G et al. "Urinary dolichol- a doubtful marker of alcoholism". *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15: 938-941.

- Sun F, Tsuritani I, Honda R, Ma ZY, Yamada Y. "Association of genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes with excessive alcohol consumption in Japanese men". *Hum Genet* 1999; 105: 295-300.

- **Takada A, Nei J, Matsuda Y.** "Clinicopathological study of alcoholic fibrosis". *Am J Gastroenterol* 1982; 77: 660- 666.
- Takashasi T, Lasker JM, Rosman AS, Lieber CS.** "Induction of P 450 E1 in human liver by ethanol is due to corresponding increase in encoding mRNA". *Hepatology* 1993; 17: 236-245.
- Takeshita T, Mao X-Q, Morimoto K.** "The contribution of polymorphism in the alcohol dehydrogenase b subunit to alcohol sensitivity in a Japanese population. *Hum Genet* 1996; 97: 409- 413.
- Takeshita T, Maruyama S, Morimoto K.** "Relevance of both daily hassles and the ALDH2 genotype to problem drinking among Japanese male workers". *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22 (1): 115-120.
- Takeshita T, Yang X, Inoue Y, Sato S, Morimoto K.** "Relationship between alcohol drinking, ADH2 and ALDH2 genotypes, and risk for hepatocellular carcinoma in Japanese". *Cancer Lett* 2000; 149 (1-2): 69-76.
- Tamame E.** "Alcohol y aparato digestivo en el anciano". *Geriatrka* 1988; 4 (9): 432-435.
- Thomas AP, Rozanski DJ, Renard DC, Rubin E.** "Effects of ethanol on the contractile function of the heart: a review". *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 121-131.
- Thomasson HR, Edenberg HJ, Crabb DW, Mai XL, Jerome RE, Li TK et al.** "Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men". *Am J Hum Genet* 1991; 48: 677- 681.
- Thurman RG.** "Mechanisms of hepatic toxicity. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin". *Am J Physiol Gastrointest liver Physiol* 1998; 275: G 605- G 611.
- **Tsutsumi M, Wang JS, Takase S, Takada A.** "Hepatic messenger RNA contents of cytochrome P 4502E1 in patients with different P4502E1 genotypes". *Alcohol* 1994; 29 (Supp.1): 29-32.
- Upadhaya S, Tirumalai S, Boyd MR, Mori T. Ravindranath V.** "Cytochrome P 450 2E (CYP2E1) in brain: Constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization". *Arch Biochem Biophys* 2000; 373: 23-24.
- Vidal F, Perez J, Pasinello J, Toda R, Gutiérrez C, Richar T et al.** "Atypical liver alcohol dehydrogenase in Spanish population. Its relation with the development of alcoholic liver disease". *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 782-785.
- Wagstaff A.** "Government prevention policy and the relevance of cost estimates". *Br J Addiction* 1987; 82: 461-467.
- **Wall TL, Johnson ML, Horn SM, Carr LG, Smith TL, Schuckit MA.** "Evaluation of the self-rating of the effects of alcohol form in Asian Americans with aldehyde dehydrogenase polymorphisms." *J Stud Alcohol* 1999; 60 (6): 784-789.
- **Wallach J.** "Enfermedades hepatobiliares y pancreáticas". En: *Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio*. Wallach J.Ed Masson SA.Barcelona 2002; 255-275.
- **Wallach J.** "Enfermedades hematológicas". En: *Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio*. Wallach J.Ed Masson SA. Barcelona 2002; 424-428.

-Wan YJ, Poland RE, Lin KM. "Genetic Polymorphism of CYP2E1, ADH2 and ALDH2 in Mexican-Americans". *Genet Test* 1998; 2: 79- 83.

-Webb GR, Redman S, Hennrikus DJ, Kelman GR, Gibberd RW, Sansón-Fisher RW. "The relationship between high-risk and problem drinking and the occurrence of work injuries and related absences". *J Stud Alcohol* 1994; 55: 434-446.

-Wetterling T, Kanitz RD, Rumpf HJ, Hapke U, Fischer D. "Comparison of cage and mast with the alcohol markers CDT, gamma-GT, ALAT, ASAT and VCM". *Alcohol* 1998; 33 (4): 424-430.

-Wetzel JW. "Universal Mental Health Classification Systems:Reclaiming women's experience". *Affilia* 1991;6(3): 8-31.

- Whitfield JB, Nightingale BN, Bucholz KK, Madden PAF, Heath AC, Martin NG. "ADH genotypes and alcohol use and dependence in Europeans". *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 1463-1469.

-Wiberg A et al. "Low platelet monoamine oxidase activity in human alcoholics." *Med Biol* 1977; 18: 181-186.

-Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. "Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany:a 20-year multicenter study". *Hepatology* 2000; 32: 91-96.

-Wilson C, Oxford J. "Children of alcoholics". *Journal of studies on alcohol* 1978; 39 (1): 121-142.

-Wong NACS, Rae F, Simpson KJ, Murray GD, Harrison DJ. "Genetic polymorphism polymor-

phism of cytochrome P4502E1 and susceptibility to alcohol liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis". *J Clin Pathology* 2000; 53 (2): 88- 94.

-Xiao Q, Weiner H, Johnston T, Crabb DW. "The aldehyde dehydrogenase ALDH 2*2 allele exhibits dominance over ALDH 2*1 in transduced HeLa cells". *J Clin Invest* 1995; 96: 2180-2186.

- Xu Y, Carr LG, Bosron WF, Li TK, Edenberg HJ. "Genotyping of human alcohol dehydrogenase at the ADH2 and ADH3 loci following DNA sequence amplification". *Genomics* 1988; 2: 209-214.

-Yamauchi M, Maezawa Y, Mizuhara Y et al. "Polymorphisms in alcohol metabolizing enzyme genes and alcoholic cirrhosis in Japanese patients." *Hepatology* 1995; 22: 1136-1142.

-Yersin B, Nicolet JF, Decrey H, Burnier M, Van Melle G, Pecoud A. "Screening for excessive alcohol drinking. Comparative value of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean corpuscular volume". *Arch Intern Med* 1995; 155 (17): 1907-1911.

- Yokoyama A, Muramatsu T, Omori T, Matsushita S, Yoshimizu H, Higuchi S et al. "Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms influence susceptibility to esophageal cancer in Japanese alcoholics". *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23 (11): 1705-1710.

Yoshida A, Huang IY, Ikawa M. "Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals". *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 258-261.

-Yoshihara E, Ameno K, Nakamura K, Ameno M, Itoh S, Ijiri I et al. "The effects of the ALDH 2*1/2, CYP2E1 C1/C2 and C/D genotypes on blood ethanol elimination". *Drug Chem Toxicol* 2000; 23: 371-379.

-Zimatkin SM, Deitrich RA. "Ethanol metabolism in the brain". *Addiction Biol* 1997; 2: 387-399.

- Zimatkin SM. "Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS". *J Neurochem* 1991; 56:1- 11.

7. Anexos

EUROPEAN JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE



Vol. 14, Supplement 1
September 2003
www.elsevier.com/locate/ejim

4th Congress of the European Federation of Internal Medicine

Berlin, Germany, 10-13 September, 2003

CONTENTS

Oral communication

Cardiovascular medicine I

May time of symptom onset influence mortality of myocardial infarction? Data from a prospective cohort of emergency calls

S1

Carotid artery intima-media thickness as a risk factor for cardiovascular events in diabetic and non-diabetic patients with congestive heart failure

S1

NT-proBNP values compared with invasively measured left ventricular hemodynamic parameters

S2

Is intravenous thrombolysis beneficial to elderly patients with Myocardial Infarction?

S2

Low levels of vitamin B12 as risk factor for venous thromboembolic disease (VTE)

S2

Validity of BNP for the diagnosis of left ventricular dysfunction in different situations

S2

Health-related quality of life after acute myocardial infarction. comparison between invasive and conservative procedures

S3

Determinants of B-type natriuretic peptide plasma levels variability in the population

S3

Spectral analysis of heart rate variability as a tool for pharmacological investigations: new evidence from studies on Amiodarone

S3

Infectious disease I

Post-travel related hospitalization, in Israel

S4

Positive surveillance blood culture is a predictive factor for secondary metastatic infection in patients with staphylococcus aureus bacteremia

S4

Role of comorbidity in mortality related to staphylococcus aureus bacteremia: a prospective study using the Charlson weighted index of comorbidity

S4

Characteristics of lost to follow-up patients during anti-tuberculosis treatment

S4

Streptococcus bovis Endocarditis a different presentation. Clinical report

S5

Extrapulmonary tuberculosis in a Department of Internal Medicine - experience of 13 years

S5

Infections caused by Acinetobacter baumannii in an Internal Medicine ward

S5

A case of tuberculous peritonitis

S6

Cerebral tuberculoma - a case report

S6

Haematology/Oncology

Fertility status among women treated for intermediate-high grade non-Hodgkin's lymphoma

S6

Non-Hodgkin's lymphoma and exposure to toxic waste in the Negev area of Israel - a GIS-assisted analysis

S7

Intravascular lymphoma with hemophagocytic syndrome and bone marrow involvement: an Asian variant in Europa?

S7

Comparison of oral vs. intravenous vitamin K in patients with excessive anticoagulation - a prospective randomized controlled study

S7

Impact of body mass index on outcomes in thromboembolic disease

S7

Long-term sequelae in survivors of childhood malignant tumors

S8

Prognostic factors in Hodgkin disease

S8

Lymphoproliferative disease of natural killer cells - case report

S8

Features of metabolism of DNA in a tumour and healthy tissues of patients with a stomach cancer

S9

Nephrology/Hypertension

Renovascular hypertension: Takayasu's disease with bilateral renal artery stenosis

S9

Accelerated-malignant hypertension

S9

(Contents continued on page 180)

Table 1

	Sex (M/F)	MCV (fl)	GOT (UI/l)	GPT (UI/l)	GGT (UI/l)
GROUP 1	24/26	89±4	40±33 (M) 50±37 (F)	77±85 (M) 69±58 (F)	47±58 (M) 61±40 (F)
GROUP 2	24/4	97±10	72±48 (M) 61±30 (F)	55±40 (M) 69±37 (F)	196±237 (M) 85±31 (F)
GROUP 3	12/14	104±8	143±47 (M) 182±124 (F)	6040±34 (M) 64±47 (F)	365±562 (M) 247±184 (F)

antibodies). Prednisone (0.5 mg/kg) was prescribed, with clear-cut improvement of symptoms and normalization of aminotransferases.

P357

Hemodynamic changes and arterial compliance in cirrhotic patients during total paracentesis

J. Kogan, S. Turkot, B. Goltzman, S. Oren (Ashkelon, IL)

Objective: Liver Cirrhosis is characterized by hyperkinetic systemic circulation, abnormal distribution of blood volume and vasodilatation with low systemic vascular resistance. Hemodynamic changes during massive paracentesis have been previously described, however large and small artery compliance have not yet been investigated. The objectives of this study were to compare various hemodynamic variables including arterial compliance in cirrhotic patients before, immediately after and 24 hours following total paracentesis.

Design and methods: The study included 15 cirrhotic patients with intractable ascites. Hemodynamic variables including vascular compliance were measured using an HDI pulse wave cardiovascular profiling instrument CR-2000. The variables were measured in these patients before, immediately after and 24 hours following large volume (mean 5.6 L) paracentesis. The patients were given a standard dose of albumin during the procedure.

Results: Large volume paracentesis was accompanied by a non-significant fall in mean arterial pressure which returned to basic level twenty-four hours later. Cardiac output increased immediately after paracentesis due to increment in stroke volume with no change in heart rate. However 24 hours later the cardiac output deteriorated to under the basic level. The fluctuation was statistically significant ($p<0.05$). There was no change in large artery compliance, however small artery compliance increased after paracentesis ($p<0.05$) and partially returned to the basic level after 24 hours. Systemic vascular resistance measurement showed the same pattern of change: vasodilatation occurred during paracentesis and was attenuated 24 hours later.

Conclusion: We conclude that large volume paracentesis with albumin replacement caused temporary improvement in cardiac output and an accentuation of the vasodilation (small but not large artery) already present in these patients

P358

Conventional biological markers utility: alcoholism and liver disease

A. Segado, F. Gomez-Gallego, C. Santiago, J. Girones, C. Cortes, J. Sanz, R. Bañares, E. Alvarez, F. Bandrés (Madrid, E)

In order to evaluate the utility of some conventional biological markers, representative of alcohol consumption, in the identification of alcohol intake in patients with different kind of liver disease, we determined levels of erythrocyte mean corpuscular volume (MCV), glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvate transaminase (GPT) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) in 105 Spanish patients with liver disease classified in the following groups, taking as a basis the

alcohol consumption: GROUP 1: Non-alcoholic patients (N=50); GROUP 2: Alcoholic patients without alcoholic acute hepatitis (AAH) (N=30); GROUP 3: Alcoholic patients with AAH (N=25), where criteria for alcoholism was established as an ingestion of alcohol higher than 80 g/day during the last 5 years. Analytic determination of MVC were performed in an haematological counter 'Coulter Hens' whereas GOT, GPT and GGT levels were determined by colorimetric immunoassay in an autoanalyzer Roche-Hitachi Modular P. Results are shown in Table 1.

Conclusions: 1.- Alcoholic patients (GROUPS 2 and 3) had larger MCV values than non-alcoholic subjects (GROUP 1).

2.- GOT and GGT activities were significantly greater in alcoholic patients (GROUP 3>GROUP 2) than those in non-alcoholic patients.

3.- GPT is a low specific marker as reveal the similar activity levels found in all the three groups studied.

4.- The combination of several conventional biological markers could be useful in the diagnostic of early states of alcoholism in patients with liver disease.

Work partially supported by grant from the Fundación Mapfre Medicina (2001/2002).

P359

Genetic polymorphisms in ADH2 and ALDH2 are not related with alcoholic acute hepatitis

F. Gomez-Gallego, A. Segado, C. Santiago, M.L. Herranz, R. Salomon, E. Vilalta, R. Bañares, E. Alvarez, F. Bandrés (Madrid, E)

In order to elucidate the possible relationship of genetic variants ADH2*2 and ADH2*3 of alcohol dehydrogenase 2 (ADH2) and ALDH2*2 of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) with alcohol sensitivity and any possible association with development of alcohol liver disease, we have investigated the presence of mutations R47H (ADH2*2) and R369C (ADH2*3) of ADH2 and E487K (ALDH2*2) of ALDH2 in 90 Spanish patients with liver disease in order to determine the prevalence of mutated enzymes and any association between genetic mutations and alcoholic acute hepatitis (AAH). Mutations in ADH2 and ALDH2 were tested by PCR amplification followed by Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's) approach in the following groups, taking as a basis the liver biopsy and alcohol consumption: GROUP 1: Non-alcoholic patients; GROUP 2: Alcoholic patients without AAH; GROUP 3: Alcoholic patients with AAH. Criteria for alcoholism were an ingestion of alcohol higher than 80 g/day during the last 5 years. Genotype and allele frequencies are shown in Tables 1 and 2, respectively.

These results show that the mutations analysed are not involved in

Table 1

	ADH2*1/*1	ADH2*1/*3	ALDH2*1/*1
GROUP 1	0.77	0.23	1.00
GROUP 2	0.85	0.15	1.00
GROUP 3	0.88	0.12	1.00

Table 2

	ADH2*1	ADH2*3	ALDH2*1
GROUP 1	0.89	0.11	1.00
GROUP 2	0.96	0.04	1.00
GROUP 3	0.94	0.06	1.00

AAH, since there are not significant differences between groups. Additionally, these results suggest further studies to elucidate the role of R369C mutation in the protector effect against alcohol consumption.

Work partially supported by grant from the Fundación Mapfre Medicina (2001/2002)

P360

Are genetic mutations in CYP2E1 related with alcoholic acute hepatitis?

A. Segado, C. Santiago, M.L. Herranz, E. Visus, M.L. Solano, J. García-Castaño, R. Bañares, E. Alvarez, F. Bandrés F. Gomez-Gallego (Madrid, E)

Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is one of the enzymes involved in the oxidative metabolism of ethanol via the non-alcohol dehydrogenase system through the microsomal ethanol-oxidizing system. It is induced in liver by excessive alcohol consumption, producing high amounts of acetaldehyde in liver cells.

In order to determine whether there is an association between some genetic polymorphisms in CYP2E1 and pathogenesis of alcoholic acute hepatitis (AAH), we investigated the presence of mutations Rsa I and Pst I restriction sites in the 5' flanking region of CYP2E1 leading to c1 and c2 alleles in the following 90 Spanish patients with liver disease: GROUP 1: Non-alcoholic patients (N=40); GROUP 2: Alcoholic patients without AAH (N=24); GROUP 3: Alcoholic patients with AAH (N=26). Criteria for alcoholism were an ingestion of alcohol higher than 80 g/day during the last 5 years.

DNA were obtained from liver biopsies and mutations were tested by PCR amplification followed by Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's) approach in both regions of CYP2E1. The investigated mutations were not found in homozygosis. The genotype and allele frequencies of variants c1 and c2 are illustrated in Tables 1 and 2 respectively.

The results show a higher frequency of c2 allele in GROUP 3 than in GROUPS 1 and 2. As c2 allele has been considered to relate to higher enzyme activity in the liver, these preliminary results suggests an important role of CYP2E1 mutations in the development of AAH.

Work partially supported by grant from the Fundación Mapfre Medicina (2001/2002).

Table 1

	CYP2E1 c1/c1	CYP2E1 c1/c2
GROUP 1	0.90	0.10
GROUP 2	0.87	0.13
GROUP 3	0.46	0.54

Table 2

	CYP2E1 c1	CYP2E1 c2
GROUP 1	0.95	0.05
GROUP 2	0.94	0.06
GROUP 3	0.73	0.27

P361

Use and overuse of acid-suppressive therapy in a central hospital

A. Baltas, N. Tzima, L. Mourgos, A. Chantzis, P. Tsiodra, S. Chini, A. Efstratopoulos (Athens, GR)

Background: International data suggest an overuse of acid suppressive (a/s) therapy outside and inside hospital that increases cost and must be considered in health policy decisions.

Objectives: To describe the frequency of a/s therapy used during hospitalization and prescribed on discharge note and also, to estimate the extent to which this use is indicated.

Method: We reviewed the charts of 617 inpatients, 318 men (51.5%) and 299 women, with a median age of 64 years (15–98). The criteria for therapeutic indication of a/s therapy were based on F.D.A. instructions and international bibliography.

Results: 320 out of 617 patients (51%) have received a/s therapy: 271 have received proton pump inhibitors (PPIs) and 49 type 2 histaminergic (H2) antagonists. Of 320 patients, there was an absolute therapeutic indication in 213 (66.5%). Most common indications for acid suppressive therapy were: peptic ulcer, gastric bleeding, oesophagitis, gastric protection from NSAIDs and stress ulcer in critical-ill patients. The administration of a/s therapy was not completely justified, when given for epigastric pain, hernia, gastric protection from corticosteroids, acute pancreatitis or unknown reason. 54 patients (9.5% of 617) had received a/s therapy before hospitalization: 38 patients used PPIs and 21 H2 antagonists. In 56% of these cases, the use of a/s therapy was not justified. Of the patients that reported use of a/s drugs before hospitalization, 43 continued this therapy during hospitalization. The administration of a/s drugs was recommended to be continued on their way out of hospital in 197 of the 320 patients (61.5%).

Conclusions: The use of a/s therapy during hospitalization is very spread but not always justified. The most used a/s drugs are PPIs. When an a/s therapy is used before hospitalization, it continues during hospitalization in most of cases. Eventually, we must notice that most inpatients come out of hospital with an instruction for continuation of a/s therapy. The use of a/s therapy must be limited in cases which an absolute indication exists.

P362

Azathioprine and methylprednisolone for the treatment of idiopathic granulomatous hepatitis

K. Horvat-Karajz, L. Floro, Z. Jakab, P. Nagy, G. Muzes, L. Sreter (Budapest, H)

A 68-year-old male patient was admitted to our department due to fever of unknown origin with a past history of esophageal diverticulum, hypertension, radioiodine treatment of hyperthyroidism, than hypothyroidism substituted by levothyroxine. Physical examination revealed moderate hepatomegaly but no other significant alterations. Laboratory tests indicated increased erythrocyte sedimentation rate and CRP, moderate granulocytosis, elevated serum gamma-glutamyl-transferase and alkaline phosphatase activity, but normal aminotransferases (alanin aminotransferase, aspartate aminotransferase) and serum bilirubine. Repeated blood cultures were negative. Abdominal ultrasonography showed multiple hepatic lesions referred as metastases further confirming with computed tomography. Gastroscopy and colonoscopy did not find any significant gastrointestinal alterations and chest X-ray was negative. Tumor markers (alfa-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, CA19-9), and serologic tests for Toxoplasma, Toxocara, Brucella were negative. Liver biopsy was performed and the histology proved granulomatous hepatitis. After introducing low dose corticosteroid (8 mg/day methylprednisolone) therapy no fever was present. However, three months later fever started again so treatment was completed by orally administered cyclophosphamide (50 mg/day). A further afebrile period

ORGANIZAN



DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA
Y LEGISLACIÓN SANITARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID



Agencia Antidroga
CONSEJERÍA DE SANIDAD

Comunidad de Madrid

SEMINARIO INTERNACIONAL DE
TOXICOLOGÍA Y LEGISLACIÓN SANITARIA

DROGODEPENDENCIAS: MARCO JURÍDICO Y CUESTIONES BIOMÉDICAS

28 Y 29 DE NOVIEMBRE DE 2002

LIBRO DE PONENCIAS Y COMUNICACIONES

EDITORES

FÉLIX GÓMEZ-GALLEGO

FERNANDO BANDRÉS MOYA

www.biolex.org

I Título

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS AL METABOLISMO DEL ETANOL EN PACIENTES CON HEPATOPATÍAS

I Autores

F. Gómez-Gallego⁽¹⁾, C. Santiago⁽¹⁾, A. Segado⁽²⁾, R. Torremocha⁽¹⁾, M. C. Salido⁽¹⁾, R. Bañares⁽²⁾, E. Álvarez⁽³⁾ y F. Bandrés⁽¹⁾

I Centro

⁽¹⁾Laboratorio de Biopatología. Dpto. de Toxicología y Legislación Sanitaria. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. ⁽²⁾Servicio de Medicina Interna. HGU Gregorio Marañón. ⁽³⁾Servicio de Anatomía Patológica. HGU Gregorio Marañón.

I Texto

Con objeto de establecer una posible asociación entre los distintos polimorfismos genéticos de los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo del etanol y el desarrollo de hepatopatías alcohólicas, se determinó la presencia de mutaciones puntuales en los genes de alcohol deshidrogenasa (ADH), aldehído deshidrogenasa (ALDH) y el tipo 2E1 de citocromo P450 (CYP2E1) en un grupo de pacientes con distintos tipos de hepatopatías.

Se estudiaron un total de 58 pacientes clasificados en tres grupos: GRUPO 1 → No bebedores; GRUPO 2 → Bebedores sin hepatopatía alcohólica aguda (HAA) y GRUPO 3 → Bebedores con HAA.

Los sistemas enzimáticos investigados fueron los siguientes:

ADH: Mutaciones R47H (alelo ADH2*2) y R369C (alelo ADH2*3); ALDH2: Mutación E487K (alelo ALDH2*2) y CYP2E1: Mutaciones correspondientes a los alelos c1 (normal) y c2.

La determinación de las mutaciones se llevó a cabo a partir de DNA purificado de tejido hepático de cada uno de los pacientes mediante amplificación por PCR de las regiones donde se localizan las mutaciones y seguido de un posterior proceso de identificación mediante la aplicación de la técnica de SNP's.

La distribución y frecuencias de genotipos de las mutaciones analizadas en el colectivo de pacientes con hepatopatías se muestra a continuación en forma tabulada:

	ADH2*1/ ADH2*1	ADH2*1/ ADH2*3	CYP2E1 c1/c1	CYP2E1 c1/c2
GRUPO 1	0,70	0,30	0,90	0,10
GRUPO 2	0,86	0,14	0,86	0,14
GRUPO 3	0,86	0,14	0,24	0,76

Los resultados obtenidos indican una asociación entre el desarrollo de hepatopatías alcohólicas agudas y la presencia de mutaciones en el gen de CYP2E1.

ORIGINAL

Título: Susceptibilidad genética al desarrollo de hepatitis alcohólica aguda: papel de las mutaciones genéticas en alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y citocromo P450 2E1

Autores:

Antonio Segado (1)

Catalina Santiago (2)

Rafael Bañares (3)

Emilio Álvarez (4)

Fernando Bandrés (2)

Félix Gómez-Gallego (2)

Instituciones:

(1) Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Gregorio Marañón.

(2) Laboratorio de Biopatología. Dpto de Toxicología y Legislación Sanitaria. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

(3) Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Gregorio Marañón.

(4) Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Gregorio Marañón.

Correspondencia:

Dr. Félix Gómez Gallego

Dpto de Toxicología y Legislación Sanitaria.

Facultad de Medicina.

Universidad Complutense de Madrid.

Ciudad Universitaria

28040 MADRID

Tel: 91 394 13 65/15 76

Fax: 91 394 16 06

e-mail: fgomezga@med.ucm.es

RESUMEN

Objetivo: Analizar las frecuencias de mutaciones genéticas en alcohol deshidrogenasa (ADH), aldehído deshidrogenasa (ALDH) y citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y establecer su posible asociación con el desarrollo de hepatitis alcohólica aguda (HAA).

Metodología: Estudio de casos-control en un total de 85 pacientes españoles. Distinguimos tres grupos (un grupo de casos y dos grupos control) en función de lesión histológica hepática y consumo de alcohol: controles: (grupo 1= abstemios; grupos 2 = bebedores sin HAA); casos: grupo 3= bebedores con HAA). El diagnóstico de caso se estableció en base a la presencia de infiltrado de leucocitos polimorfonucleares en el estudio histológico. Analizamos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis capilar la presencia de las mutaciones genéticas R47H y R369C (ADH2), E487K (ALDH2) y la mutación *Rsa I* de CYP2E1 (alelo c2). Resultados: El alelo c2 de CYP2E1 se halló en el 10, 16 y 50% de los pacientes de los grupos 1, 2 y 3, respectivamente. La presencia de la mutación *Rsa I* mostró influencia sobre el desarrollo de HAA (*odds ratio* [OR] = 3,63; intervalo de confianza [IC] del 95%, 0,88-15,02). Conclusiones: Los datos sugieren una posible asociación entre la presencia de la mutación *Rsa I* de CYP2E1 y el desarrollo de HAA en pacientes con consumo crónico de alcohol.

Palabras clave: Polimorfismos genéticos, hepatitis alcohólica aguda, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, citocromo P450 2E1

ABSTRACT

Objective: To investigate the presence of mutations of ADH, ALDH2 and CYP 2E1, in order to elucidate the possible relationship of genetic variants and alcoholic acute hepatitis (AAH). **Methods:** This is an study of case-controls in spanish patients. We have differenced three groups (two controls subjects and one case) taking as a basis the liver biopsy and alcohol consumption: Controls: group 1= non-alcoholic patients,

group 2= alcoholic patients without AAH; case: group 3= alcoholic patients with AAH. The diagnosis in cases was established when polymorphonuclear leukocytes (sattelitosis) was observed in the histological study. We analysed genetic mutations R47H and R369C of ADH2, E487K of ALDH2 and *Rsa* I site of CYP2E1 by PCR amplification and capillary electrophoresis. Results: Frequencies of c2 allele were higher in cases than in controls (50% vs 10-16%). The presence of *Rsa* I mutation showed influence on AAH (*odds ratio* [OR] = 3,63; confident interval [95%CI], 0,88-15,02). Conclusions: These data suggested the relationship mutations *Rsa* I of CYP2E1 and AAH in patients with chronic alcohol abuse.

Key words: genetic polymorphism, alcoholic acute hepatitis, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, cytochrome P450 2E1

INTRODUCCIÓN

En la patogenia de la enfermedad hepática alcohólica existen tres fenómenos, interrelacionados entre sí y que hay que tener en cuenta a la hora de plantear nuevas estrategias terapéuticas: el estrés oxidativo, la liberación de citocinas proinflamatorias-profibrogénicas y el aumento de la síntesis de colágeno. La activación del sistema oxidativo microsomal del etanol (MEOS) es un factor fundamental en el estrés oxidativo cuya consecuencia más importante es una depleción de los sistemas antioxidantes como el glutatión, el tocoferol y el ácido ascórbico, lo que favorece la peroxidación lipídica y el daño celular (1). El término hepatitis alcohólica aguda (HAA) define una lesión histológica (áreas de necrosis con infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares, degeneración hidrópica de los hepatocitos, presencia de hialina de Mallory y megamitocondrias), con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que varían desde formas asintomáticas hasta cuadros de insuficiencia hepática grave. En la HAA influyen factores conocidos (sexo, estado nutricional o consumo de alcohol) y otros aún por determinar como son las mutaciones genéticas de las enzimas que intervienen en el metabolismo del alcohol (2, 3). En este sentido, se ha descrito la influencia de polimorfismos genéticos en alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH) sobre los patrones de consumo de etanol, hepatopatía alcohólica y enfermedades relacionadas en población no oriental (4-8), si bien su relación con HAA no ha sido establecida. El gen ADH2 da lugar a tres tipos de subunidades beta: (ADH 2*1, ADH 2*2 y ADH 2*3). ADH 2*2 difiere en la sustitución de un residuo de arginina por uno de histidina en la posición 47 de la proteína (R47H) (9); ADH 2*3 presenta una sustitución de cisteína por arginina en la posición 369 de la proteína (R369C) (10). La ALDH mitocondrial presenta un polimorfismo, funcionalmente inactivo, denominado ALDH2*2, resultado de un cambio de un residuo de glutámico por uno de lisina en posición 487 (11). Adicionalmente, el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) constituye el principal componente del sistema MEOS. Debido a que es un sistema inducible por etanol, ante situaciones de un consumo crónico, su

contribución metabólica puede aumentar considerablemente, variando desde el 3 – 8% hasta un 22% (12-13). En este gen se ha descrito un polimorfismo en la región del promotor, denominándose los correspondientes alelos c1 y c2 en base a sus diferencias a nivel de la regulación de la transcripción, siendo la actividad transcripcional más acusada en el tipo c2 que en el c1 (14-15). La asociación entre el alelo c2 de CYP2E1, consumo de alcohol y hepatopatía ha sido estudiada en diferentes grupos étnicos con resultados contradictorios (15-17), sin embargo su influencia en HAA no ha sido bien establecida.

En el presente trabajo, pretendemos examinar la posible influencia que pueden ejercer ciertos genotipos de las enzimas que intervienen en el metabolismo del etanol sobre el desarrollo de HAA en dos grupos de pacientes con patrones de consumo crónico de etanol similares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes: Se realizó un estudio de casos y controles, en un total de 85 pacientes españoles (50 hombres y 35 mujeres), clasificados en los siguientes tres grupos: GRUPO 1 o no bebedores (n= 30, 13 varones, 17 mujeres) (edad media: $43,9 \pm 11,7$ años), pacientes abstemios que fueron biopsiados entre los meses de enero de 2002 y marzo de 2003 para estudio de hipertransaminemia de origen desconocido o virus de hepatitis B o C positivo. GRUPO 2 o bebedores sin HAA (n= 25, 20 varones y 5 mujeres) (edad media: $49,0 \pm 8,8$ años), pacientes biopsiados en el mismo periodo de tiempo que los del grupo 1, con diagnóstico histológico de hepatopatía alcohólica en grado diverso (desde esteatosis leve-moderada a cirrosis) sin infiltrado inflamatorio agudo de polimorfonucleares en biopsia hepática. GRUPO 3 o bebedores con HAA (n= 30, 16 varones y 14 mujeres) (edad media: $45,5 \pm 10,5$ años), pacientes biopsiados entre los años 1995 y 2003, con diagnóstico histológico de HAA, definido fundamentalmente por la presencia de infiltrado polimorfonuclear, además de degeneración hidrópica de hepatocitos, presencia de hialina de Mallory y

megamitocondrias. Los controles estaban constituidos por los pacientes de los grupos 1 y 2 y los casos por los del grupo 3. Todas las biopsias proceden del archivo del Departamento de Anatomía Patológica y fueron realizadas en el Servicio de Aparato Digestivo del HGU Gregorio Marañón (Madrid). Fueron excluidos en todos los grupos los pacientes biopsiados tras trasplante hepático y 6 pacientes con muestra escasa para estudio genético.

Las muestras se procesaron de manera habitual tras la realización de la biopsia, habitualmente por vía transyugular. Tras la realización de las técnicas histológicas correspondientes fueron incluidas en bloques de parafina según técnicas habituales.

El consumo de alcohol se determinó en base al concepto de Unidad de Bebida Estándar (UBE) (18), excluyendo a aquellos individuos con consumos inferiores a 3 UBEs/día o tiempos de consumo inferiores a cinco años.

La obtención de datos relativos a consumos de etanol por día se realizó mediante entrevistas personales (test psicométricos CAGE y MALT), telefónicas y/o datos de la historia clínica (en pacientes fallecidos del grupo 3), empleándose al menos dos métodos para evaluar los consumos de alcohol. Las características generales de los grupos, resumidas en la Tabla 1, muestran que el porcentaje de bebedores excesivos (> 9 UBES/día) es similar en los grupos 2 y 3. Todos los sujetos incluidos en los Grupos 2 y 3 eran consumidores activos y en las cantidades reflejadas en el momento de la biopsia.

El presente estudio cumple los criterios éticos aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Determinación de mutaciones genéticas: Para la realización de las determinaciones genotípicas se purificó DNA genómico a partir de muestras de biopsia hepática de cada uno de los pacientes mediante un método de extracción con fenol/cloroformo seguido de precipitación alcohólica. El análisis de las mutaciones R47H y R369C del gen ADH2, E487K del gen ALDH2 y las correspondientes a los alelos c1 y c2 del gen CYP11E1 se llevó a cabo mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) empleando parejas de cebadores específicos que flanquean los codones donde se localizan las mutaciones, diseñados de forma individualizada, a partir de las secuencias de genes disponibles en el Gene Bank. Para la identificación de la mutación R47H de ADH2 se emplearon los siguientes cebadores: 5'-TGTAGATGGTGGCTGTAGGA y 5'-GGCTGCCTCATGGCCTAAA en las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial 95 °C 5 min; 35 ciclos de 95 °C 1 min, 55 °C 45 seg, 72 °C 30 seg; extensión final 72 °C 10 min. Para la identificación de la mutación R369C de ADH2 se emplearon los siguientes cebadores: 5'-TGTCTCTTCTTTCTTCTATTGC y 5'-TGTAGGGTAGAGGAGGCTGA en las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial 95 °C 5 min; 35 ciclos de 95 °C 1 min, 52 °C 45 seg, 72 °C 30 seg; extensión final 72 °C 10 min. Para la identificación de la mutación E487K de ALDH2 se emplearon los siguientes cebadores: 5'-TCACCCTTTGGTGGCTAC y 5'-CAGGTCCCACACTCACAG en las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial 95 °C 5 min; 35 ciclos de 95 °C 1 min, 53 °C 45 seg, 72 °C 30 seg; extensión final 72 °C 10 min. Para la identificación de la mutación *Rsa I* de la región 5' de CYP11E1 se empleó la siguiente pareja de cebadores: 5'-TATTTTCTTCATTTCTCATC y 5'-CTGGCAATATATAGAAGTTC en las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial 95 °C 5 min; 35 ciclos de 95 °C 1 min, 50 °C 45 seg, 72 °C 30 seg; extensión final 72 °C 10 min.

La identificación de las mutaciones se llevó a cabo mediante la aplicación de la técnica de *Single Base Extension* (SBE) en un secuenciador automático de DNA, *ABI 310 Genetic Analyzer* empleando el kit comercial *ABI PRISM[®] SnaP Shot[®] Multiplex* (*Applied Biosystems*). Para ello se realizó una segunda reacción de PCR para cada una de las mutaciones a analizar en las que se utilizaron los siguientes cebadores específicos apropiados para la técnica de SBE: 5' -TAACCACGTGGTCATCTGTG para R47H DE ADH2, 5' -ATTGCCTCAAACGTCAGGACGGTAC para R369C de ADH2, 5' -ACGGGCTGCAGGCATACACT para E487K de ALDH2, y 5'-ATACATAAAGATTTCATTGTTAATATAAAAGTA para la mutación *Rsa I* de CYP11E1.

Los fragmentos así obtenidos fueron posteriormente visualizados mediante electroforesis capilar en el secuenciador automático.

Análisis estadístico: Para la comparación de variables categóricas se utilizó la prueba de χ^2 de Pearson y la prueba exacta de Fisher (nivel de significación estadística = 0.05). Para la valoración del efecto de las mutaciones estudiadas sobre el desarrollo de HAA se realizó un modelo explicativo de regresión logística incluyendo como variables independientes el género, consumo de alcohol, polimorfismos genéticos y la presencia de anticuerpos anti-VHC. No se contempló la presencia de variables modificadoras de efecto por el tamaño muestral estudiado. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 11.0 para Windows.

RESULTADOS

Se han identificado las mutaciones R47H y R369C del gen ADH2, la mutación E487K del gen ALDH2 y las correspondientes a los alelos c1 y c2 del gen CYP2E1 en un total de 85 muestras de biopsias hepáticas de otros tantos pacientes.

En las Tablas 2 y 3 se muestran, respectivamente, las frecuencias genotípicas y alélicas halladas para cada una de las mutaciones analizadas.

No se encontraron individuos homocigotos para ninguna de las mutaciones analizadas. Tampoco se detectaron las mutaciones R369C de ADH2 y E487K de ALDH2 en ninguna de las muestras analizadas. Estos resultados indican que los alelos ADH2*3 y ALDH2*2 no se encuentran en el colectivo analizado. La mutación R47H de ADH2 fue encontrada en heterocigosis en un total de 10 individuos, repartidos de la siguiente forma: 5 individuos del grupo 1, 2 del grupo 2 y 3 del grupo 3 (Tabla 2). Esta presencia proporciona una frecuencia del alelo ADH2*2 del 8, 4 y 5% en los grupos 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 3).

En lo referente al CYP2E1, se detectó la mutación *Rsa* I localizada en el producto de amplificación correspondiente a la zona de la región 5' del gen en 3 individuos del grupo 1, 4 del grupo 2 y 15 del grupo 3 (Tabla 2), proporcionando unas frecuencias del

alelo c2 del 5, 8 y 25% en los grupos 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 3). No se encontraron diferencias en los resultados de las distintas mutaciones por sexos, excepto una frecuencia mayor de alelo c2 entre las mujeres del grupo 3 respecto a los otros grupos (6% grupo 1, 25% grupo 2, 57% grupo 3), incluso mayor proporcionalmente al resultado obtenido en el alelo c2 entre los hombres del grupo 3 (43%). Dentro del grupo 2, 18 individuos presentaban esteatosis y 7 cirrosis, de los cuales 3 y 1 de ellos, respectivamente, eran portadores del alelo c2 de CYP2E1. Por su parte, 19 individuos del grupo 3 presentaban cirrosis, identificándose la mutación en CYP2E1 en 7 de ellos, mientras que en los 11 pacientes sin cirrosis, se detectó el alelo c2 de CYP2E1 en 8 de ellos. La presencia del alelo c2 teniendo en cuenta sexo, edad, virus B y C, consumo de alcohol fue más frecuente en los casos que en los controles (50% vs 16%, $p = 0,018$, con odds ratio [OR] = 5,25; intervalo de confianza [IC] del 95%; 1,45-19,00). El estimador del OR de la mutación c2 mediante regresión logística, ajustado por el género y presencia de virus C fue de 3,63 (IC 95%, 0,88-15,02).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se examina la relación entre la presencia de los diferentes genotipos de ADH2, ALDH2 y CYP2E1 y el desarrollo de hepatitis alcohólica aguda (HAA) en tres grupos de pacientes con distintos tipos de hepatopatías.

La relación entre la presencia del alelo ADH2*2 y su papel en el metabolismo del etanol ha sido ampliamente estudiado en la literatura publicada. Teniendo en cuenta su mayor afinidad por el etanol, se ha postulado con un papel protector frente al alcoholismo en población oriental (19, 20) y en población caucasoide (4, 8). Ciertos trabajos también han analizado la relación de estos polimorfismos con el desarrollo de enfermedades hepáticas, con resultados discrepantes (5-7, 21).

En nuestro colectivo analizado, la frecuencia del alelo normal, ADH2*1, es significativamente mayor en los tres grupos estudiados y similar a las descritas en otros estudios con población caucasoide (4, 5). No se detectaron individuos

homocigotos para ninguna de las dos mutaciones estudiadas al tiempo que el alelo ADH2*3 no se detectó en ningún individuo. Tampoco se encontraron diferencias significativas en las frecuencias del alelo ADH2*2 entre los tres grupos de pacientes, lo cual apoya la idea de que no desempeñan un papel relevante ni en el consumo de alcohol ni en el desarrollo de hepatopatías alcohólicas.

Desde un punto de vista clínico, la mutación E487K del gen ALDH2 constituye el principal factor genético que influye en los patrones de consumo de alcohol. Aunque esta mutación presenta una elevada prevalencia en poblaciones orientales, donde hasta un 50% de los individuos son portadores (22,23), en poblaciones no orientales su incidencia es prácticamente nula (16, 24,25), lo cual es coincidente con los resultados obtenidos en nuestro colectivo.

El otro sistema relevante implicado en el metabolismo del etanol es el sistema MEOS, inducible en los casos de consumo crónico de etanol. En el presente trabajo se lleva a cabo un análisis del gen CYP2E1 de citocromo P4502E1 que da lugar a los polimorfismos c1 y c2. Esta mutación está localizada en la región del promotor y por lo tanto los efectos se van a producir a nivel de la cantidad de proteína sintetizada. Desde un punto de vista fisiológico, el alelo c2 presenta una tasa de transcripción mayor que el c1 y por lo tanto un mayor nivel de actividad enzimática (14).

Se ha descrito que individuos japoneses con el genotipo c2/c2 de CYP2E1 presentan mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades hepáticas alcohólicas, al tiempo que se ha descrito una interacción entre los genotipos de ALDH2 y CYP2E1 con el consumo de alcohol, de forma que los portadores del alelo c2 de CYP2E1 y del genotipo normal de ALDH2 presentarán una mayor tolerancia al consumo de alcohol y al desarrollo de enfermedades hepáticas asociadas (14, 17). Según esta explicación, en aquellos individuos bebedores y portadores del alelo c2 de CYP2E1 se puede producir una cantidad de acetaldehído superior a los portadores del alelo normal, debido a la mayor actividad enzimática del citocromo, que aunque será posteriormente transformada en acetato vía ALDH2, puede tener un papel relevante en el desarrollo

de hepatopatías alcohólicas, habida cuenta del tiempo que puede permanecer en hígado hasta que la ALDH2 es capaz de eliminarlo (17). En nuestro colectivo analizado no se detectaron individuos homocigotos para el genotipo c2/c2, únicamente se encontraron individuos c1/c1 y heterocigotos c1/c2. Los resultados obtenidos revelan aspectos muy interesantes en cuanto a las prevalencias de los alelos en los diferentes grupos. Se observa que el alelo c2 presenta una frecuencia muy baja en los controles, donde únicamente un 10% (grupo 1) y un 16% (grupo 2) de los individuos resultaron ser portadores del alelo c2. La presencia del alelo c2 es más frecuente en los casos que en los controles (50% vs 16%, $p = 0,018$, OR= 5.25, IC 95%, siendo el estimador del OR de la mutación c2 ajustado por género y presencia de anti-VHC de 3.63 (IC 95%), demostrando la fuerte asociación entre alelo c2 y HAA. En este sentido, cabe destacar la ausencia de estudios similares realizados sobre pacientes con HAA, si bien existen algunos trabajos que establecen una asociación entre la presencia del alelo c2 de CYP2E1 y el riesgo de hepatopatía alcohólica en población oriental (15, 26). Por el contrario, en poblaciones no orientales los resultados son discrepantes, ya que existen trabajos que relacionan la mutación con la enfermedad hepática alcohólica (27) y otros que lo niegan (28-31), aunque normalmente se trata de estudios realizados sobre pacientes con cirrosis. El papel del sistema MEOS en la patogenia de la enfermedad hepática alcohólica es importante a través de la activación del estrés oxidativo que conllevaría una depleción de sistemas antioxidantes como el glutatión (1). En este sentido, sería posible sugerir un mecanismo, en el que el desarrollo de HAA aguda estaría relacionado con la presencia del alelo c2 de CYP2E1, de modo que ante dos pacientes bebedores crónicos con activación del sistema MEOS, sería quizás, en último término la predisposición genética de los mismos la que determinaría el desarrollo o no de HAA.

Aunque un inconveniente del presente estudio estriba en el escaso número de muestras, sobre todo en los casos, si bien se puede considerar representativo del porcentaje de pacientes que desarrollan HAA, sobre todo teniendo en cuenta que la

confirmación histológica del diagnóstico de HAA es muy poco habitual, los resultados mostrados ponen de manifiesto la conveniencia de realizar posteriores trabajos con series más amplias. El presente trabajo permite observar la existencia de una clara asociación entre el desarrollo de HAA y la presencia del alelo c2 de CYP2E1, lo cual puede tener una importancia relevante en la detección precoz de individuos de riesgo en cuanto a la predisposición genética al desarrollo de HAA en situaciones de consumo excesivo de alcohol.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido parcialmente financiado por la Fundación Mapfre Medicina, a través de la Convocatoria de Becas de Investigación 2001/2002. Agradecemos a M. Luisa Herranz su labor en la recopilación de las muestras biológicas y a David Martínez sus comentarios en la parte estadística.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lieber CS. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *J Hepatol* 2000; 32 (suppl 1): 113-128.
- (2) Caballería J, Montull S, Parés A. Malnutrición en el alcoholismo crónico: Importancia en la fisiopatología y tratamiento de la hepatopatía alcohólica. *Gastroenterol Hepatol* 1991; 14: 82-89.
- (3) Caballería J. Hepatitis alcohólica aguda. En: Tratamiento de las enfermedades hepáticas y biliares. Asociación Española para el estudio del Hígado 2001; 91-98.
- (4) Whitfield JB, Nightingale BN, Bucholz KK, Madden PAF, Heath AC, Martin NG. ADH genotypes and alcohol use and dependence in Europeans. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 1463-1469.
- (5) Pares X, Farres J, Pares A, et al. Genetic polymorphism of liver alcohol dehydrogenase in Spanish subjects: significance of alcohol consumption and liver disease. *Alcohol Alcohol* 1994; 6: 701-705.
- (6) Vidal F, Perez J, Morancho J, Pinto B, Richart C. Hepatic alcohol dehydrogenase activity in alcoholic subjects with and without liver disease. *Gut* 1990; 31: 707-711.
- (7) Couzigou P, Fleury B, Groppi A, Cassaigne A, Begueret J, Iron A. Genotyping study of alcohol dehydrogenase class I polymorphism in French patients with alcoholic cirrhosis. The French Group for Research on Alcohol and Liver. *Alcohol Alcohol*. 1990; 25:623-626.
- (8) Borrás E, Coutelle C, Rosell A. et al. Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in europeans: the ADH2*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated with ADH3*1. *Hepatology*. 2000; 31:984-989.
- (9) Matsuo Y, Yokoyama R, Yokoyama S. The genes for human alcohol dehydrogenases beta 1 and beta 2 differ by only one nucleotide. *Eur J Biochem*. 1989; 183:317-320.

- (10) Burnell JC, Carr LG, Dwulet FE, Edenberg HJ, Li T-K, Bosron WF. The human beta(3) alcohol dehydrogenase subunit differs from beta-1 by a cys for arg-369 substitution which decreases NAD(H) binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 146:1227-1233.
- (11) Yoshida A, Huang I-Y, Ikawa M. Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1984; 81:258:261.
- (12) Upadhy SC, Tirumalai PS, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V. Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 373:23-34.
- (13) Song BJ. Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 update. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20 (8 Suppl):138A-146A.
- (14) Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphism in the 5'flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem (Tokyo)* 1991; 110: 559-565.
- (15) Tsutsumi M, Wang JS, Takase S, Takada A. Hepatic messenger RNA contents of cytochrome P4502E1 in patients with different P4502E1 genotypes. *Alcohol Alcohol* 1994; 29 (Suppl 1): 29-32.
- (16) Konishi T, Calvillo M, Leng AS, et al. The ADH3*2 and CYP2E1 c2 alleles increase the risk of alcoholism in Mexican American men. *Exp Mol Pathol.* 2003; 74:183-189.
- (17) Sun F, Tsuritani I, Honda R, Ma ZY, Yamada Y. Association of genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes with excessive alcohol consumption in Japanese men. *Hum Genet* 1999; 105: 295-300.

- (18) Rodríguez-Martos A, Gual A, Llopis JJ. La “unidad de bebida estándar” como registro simplificado del consumo de bebidas alcohólicas y su determinación en España. *Med Clin (Barc)* 1999; 12: 446-450.
- (19) Muramatsu T, Wang ZC, Fang YR et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and drinking behavior of Chinese living in Shanghai. *Hum Genet* 1995; 96: 151-154.
- (20) Shen YC, Fan JH, Edenberg HJ, et al. Polymorphism of ADH and ALDH genes among four ethnic groups in China and effects upon the risk for alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997; 21:1272-1277.
- (21) Chen CC, Lu RB, Chen YC, Wang MF, Chang YC, Li TK, Yin SJ. Interaction between the functional polymorphisms of the alcohol-metabolism genes in protection against alcoholism. *Am J Hum Genet*. 1999; 65:795-807.
- (22) Chao YC, Liou SR, Chung YY, et al. Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase genes and alcoholic cirrhosis in Chinese patients. *Hepatology* 1994; 19: 360-366.
- (23) Xiao Q, Weiner H, Johnston T, Crabb DW. The aldehyde dehydrogenase ALDH 2*2 allele exhibits dominance over ALDH 2*1 in transduced HeLa cells. *J Clin Invest* 1995; 96: 2180-2186.
- (24) Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, et al. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum Genet* 1992; 88: 344-346.
- (25) Nuutinen HU. Activities of ethanol-metabolizing enzymes in liver diseases. *Scand J Gastroenterol*. 1986; 21: 678-684.
- (26) Tanaka F, Hiratori Y, Yokosuka O, Imazeki F, Tsukada Y, Omata M. Polymorphism of alcohol-metabolizing genes affects drinking behavior and alcoholic liver disease in Japanese men. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 596-601.

- (27) Pirmohamed M, Kitteringham NR, Quest LJ, et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 351-357.
- (28) Agundez J, Ladero J, Diaz-Rubio M, Benitez J. Rsa I polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus is not related to the risk of alcohol-related severe liver disease. *Liver* 1996; 16:380-383.
- (29) Carr LG, Hartleroad JY, Liang Y, Mendenhall C, Moritz T, Thomasson H. Polymorphism at the P450IIE1 locus is not associated with alcoholic liver disease in Caucasian men. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995;19:182-184.
- (30) Lucas D, Menez C, Floch F, et al. Cytochromes P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic caucasians. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20:1033-1037.
- (31) Parsian A, Cloninger CR, Zhang ZH. Association studies of polymorphisms of CYP2E1 gene in alcoholics with cirrhosis, antisocial personality, and normal controls. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; 22: 888-891.